

Université de Sherbrooke

**Étude des partenaires impliqués dans le trafic du récepteur opioïde delta vers la
membrane plasmique**

Par
Francis Bergeron
Programme de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Janvier, 2020

Louis Gendron PhD
Christine Lavoie PhD
Rona Graham PhD
Guylain Boulay PhD

Membres du jury d'évaluation
Programme de Physiologie ; Directeur de recherche
Programme de Pharmacologie ; Co-Directrice de recherche
Programme de Physiologie ; Évaluatrice interne
Programme de pharmacologie ; Évaluateur externe

© Francis Bergeron, 2020

RÉSUMÉ

Étude des partenaires impliqués dans le trafic du récepteur opioïde delta vers la membrane plasmique

Par

Francis Bergeron

Programme de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les opioïdes sont les médicaments les plus utilisés dans le traitement des douleurs modérées à sévères, mais l'utilisation de ceux-ci s'accompagne de plusieurs effets secondaires néfastes tels la constipation et la dépression respiratoire ainsi qu'un haut risque de tolérance et dépendance. Comme en témoigne la crise des opioïdes qui touche actuellement le Canada et les États-Unis, la recherche sur les opioïdes doit être considérée comme parmi les plus importantes et prioritaires. C'est pourquoi les récepteurs opioïdiques, des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), sont très étudiés. Par contre, les mécanismes entourant le trafic de ces récepteurs demeurent très peu connus. En clinique, on cible principalement le récepteur opioïde mu (MOP), par exemple avec la morphine. Cependant, son activation entraîne les effets secondaires mentionnés plus haut et de bonnes alternatives pour les traitements à long terme sont grandement nécessaires. En revanche, le récepteur opioïde delta (DOP), même s'il n'est pas encore ciblé en clinique, représente une cible de choix par ses effets analgésiques et les moindres effets indésirables. Le problème est que, contrairement à la majorité des RCPGs, le DOP est majoritairement exprimé au niveau intracellulaire en condition basale et n'est ainsi pas accessible pour ses ligands. Il est donc important de comprendre les mécanismes cellulaires qui participent au contrôle du trafic de DOP vers la membrane plasmique. Dans le cadre de ma maîtrise, je me suis intéressé aux différents mécanismes cellulaires et partenaires protéiques impliqués dans la régulation du trafic du DOP à la membrane plasmique des neurones. Dans le passé, nous avons identifié des partenaires potentiels par spectrométrie de masse à l'aide du récepteur Flag-DOP, surexprimé dans des cellules HEK293. Parmi les partenaires identifiés, la kinase Cdk5 nous intriguait puisque sa séquence consensus de phosphorylation chevauche une des séquences de liaison du complexe vésiculaire COPI au niveau de la deuxième boucle intracellulaire du DOP (ICL2). Mes travaux se sont donc orientés sur cette séquence précise afin de déterminer le rôle que cette kinase pouvait avoir sur le trafic du DOP. Nous avons montré des interactions par immunoprécipitation de p35 et Cdk5 avec le DOP. De plus, lorsque ces deux protéines sont coexprimées, elles n'interagissent plus avec le récepteur DOP. Il est connu que la phosphorylation de l'ICL2 par Cdk5 permet au récepteur de migrer vers la membrane plasmique, empêchant ainsi sa rétention au réticulum par COPI. Une co-expression de la sous-unité COPB1 et Cdk5 en présence de son activateur p35 ont montré, par immunoprécipitation, une baisse de l'interaction entre DOP et COPB1. Plusieurs essais de pull-down sur protéines purifiées ont été réalisés afin d'identifier le domaine intracellulaire du DOP où interagissent p35 et Cdk5. Une diminution de l'expression de surface du DOP par la méthode d'ELISA est aussi observée lors de l'inhibition de Cdk5 par des petits ARNs interférents, supportant un rôle pour Cdk5 dans le trafic du DOP. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans le trafic du DOP permettra d'identifier de nouvelles cibles, telle Cdk5, et ultimement de développer de meilleurs traitements contre la douleur.

Mots clés : douleur, opioïdes, DOP, trafic intracellulaire, MOP, Cdk5, p35, COPI

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	vii
Liste des abréviations	viii
1 Introduction.....	9
1.1 La Douleur	9
1.1.1 Impact de la douleur sur la société	9
1.1.2 Transmission de la douleur.....	9
1.1.3 Traitement de la douleur.....	11
1.2 Les Opiïdes.....	11
1.3 Les récepteurs aux opioïdes.....	12
1.3.1 Récepteurs couplés aux protéines G.....	12
1.3.2 Les récepteurs opioïdes.....	14
1.3.2.1 Le récepteur opioïde mu (MOP).....	15
1.3.2.2 Le récepteur opioïde kappa (KOP)	16
1.3.2.3 Le récepteur opioïde delta (DOP).....	16
1.4 Le DOP : une cible de choix pour le traitement de la douleur	17
1.4.1 Distribution du DOP.....	17
1.4.2 Trafic des RCPGs.....	18
1.4.3 Trafic du DOP	19
1.4.4 Modulation de l'expression membranaire du DOP	21
1.4.4.1 Morphine chronique.....	21
1.4.4.2 Inflammation chronique	22
1.5 Partenaires d'interaction du récepteur opioïde delta.....	23
1.5.1 Interaction du DOP avec les protéines de triage endosomal.....	23
1.5.1.1 G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP-1).....	24
1.5.1.2 Sorting nexin 1 (SNX1).....	25
1.5.1.3 Protéines de triage endosomal impliquées dans l'adressage du DOP à la membrane : NSF et NHERF-1	26

1.5.2	Coat protein complex I (COPI)	27
1.5.3	Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)	28
1.6	But de l'étude principale, objectifs et hypothèses.....	30
1.7	Projet principal : Rôle de Cdk5/p35 dans la régulation du trafic du DOP	32
1.8	Projet secondaire : Interaction du DOP avec les protéines de triage endosomal GASP-1, SNX1, NHERF-1 et NSF	33
2	Matériel et méthodes	35
2.1	Traitement et euthanasie des animaux	35
2.2	Extraction d'ARNm (RT-qPCR ; extraction).....	35
2.3	Culture cellulaire	36
2.3.1	Mise en culture et passage des différents types de cellules	36
2.3.2	Transfection	37
2.4	Immunobuvardage et co-immunoprécipitation.....	37
2.4.1	Récolte des cellules, extraction des protéines et immunoprécipitation	37
2.4.2	Immunobuvardage.....	38
2.5	Essais de GST pull-down.....	39
2.5.1	Production protéique, extraction et purification des protéines recombinantes .	39
2.5.2	Pull-down sur lysat cellulaire et protéines purifiées Histidine	41
2.5.3	Utilisation de peptides mimétiques de l'ICL3	42
2.6	Expression de surface par ELISA.....	42
2.7	DsiRNA: petits ARN interférents.....	43
3	Résultats.....	45
3.1	Interactions entre p35, Cdk5 et FlagDOP	45
3.2	Identification du domaine d'interaction de Cdk5 et p35 sur le DOP.....	49
3.3	Cdk5, en présence de son activateur p35, diminue l'interaction de COPI au DOP.....	51
3.4	Effet de l'inhibition de l'expression de Cdk5 et COPB1 par des DsiRNAs sur l'expression de surface du FlagDOP par ELISA	52
3.5	Projet connexe: interaction entre GASP-1 et le DOP.....	56
4	Discussion	58
4.1	Interactions de Cdk5 et p35 avec le DOP	58

4.1.1	Interaction de Cdk5 et p35 avec le DOP: une interaction dynamique?.....	59
4.1.2	Validation des interactions dans un modèle de cellules neuronales.....	60
4.1.3	Cdk5 et p35 forment un complexe	61
4.2	Identification du domaine d'interaction de Cdk5 et p35 sur le DOP.....	62
4.2.1	Prédiction et mutation d'un site potentiel d'interaction par ELM.....	62
4.2.2	Identification du site d'interaction par essais de <i>pull-down</i>	64
4.3	Liaison de COPB1 au DOP: l'activation de Cdk5 empêche-t-elle celle-ci?	67
4.4	Impact de l'absence de Cdk5 sur le trafic du DOP.....	69
4.5	Autres approches pour la caractérisation du site d'interaction de Cdk5	72
4.6	Interaction entre GASP-1 et le DOP	74
5	Conclusion et perspectives	76
6	Annexes.....	79
7	Liste des références.....	80

Liste des figures

Figure 1 : Transport bidirectionnel entre le réticulum endoplasmique et le Golgi.....	19
Figure 2 : Trafic d'un récepteur couplé aux protéines G de sa synthèse à son export vers la membrane plasmique.....	20
Figure 3 : Mécanismes du trafic membranaire du récepteur opioïde delta (DOP).....	23
Figure 4 : Schéma de l'arrangement des sous-unités des sous-complexes 1 et 2 du complexe COPI.....	28
Figure 5 : Le site de phosphorylation de Cdk5 chevauche un des sites de liaison de COPI dans la deuxième boucle intracellulaire du récepteur DOP.....	31
Figure 6 : Schématisation du rôle potentiel des protéines GASP et SNX1 dans la dégradation des récepteurs opioïdes delta, ainsi que NHERF-1 et NSF dans le recyclage des récepteurs opioïdes delta.....	34
Figure 7 : Interactions de Cdk5-HA et p35-myc avec le FlagDOP par co-immunoprécipitation.....	46
Figure 8 : Interactions entre Cdk5 et p35 avec FlagDOP par co-immunoprécipitation dans un modèle de cellules neuronales NG108-15.....	47
Figure 9 : Cdk5-HA co-immunoprécipite avec p35-myc en absence (A) ou en présence (B) du récepteur opioïde delta.....	48
Figure 10 : Liaisons non-spécifiques de Cdk5 et p35 avec les différents domaines intracellulaires du DOP.....	49
Figure 11 : Liaison de Cdk5 (A) à la troisième boucle intracellulaire du DOP et (B) au mutant T161E de la deuxième boucle intracellulaire.....	51
Figure 12 : L'interaction entre COPB1 et DOP est diminuée lorsque la Cdk5 endogène est en présence de p35.....	52
Figure 13 : Validation des DsiRNAs contre Cdk5 et COPB1 dans différentes cellules HEK293	53
Figure 14 : Effet de Cdk5 dans la régulation de l'expression de surface du récepteur opioïde delta.....	55
Figure 15 : La protéine GASP-1 interagit avec le récepteur opioïde delta par co-immunoprécipitation sur cellules AD293 transfectées.....	57
Figure 16 : Schématisation de la séquence en acides aminés de la troisième boucle intracellulaire du DOP....	72

Liste des tableaux

Tableau 1 : Séquence des peptides mimétiques de la troisième boucle intracellulaire du récepteur opioïde delta de rat.....	42
Tableau 2 : Effet des DsiRNAs sur l'expression de surface du récepteur opioïde delta.....	56
Tableau 3 : Prédiction effectuée par l'outil de recherche Eukaryotic Linear Motif sur la séquence FASTA de récepteur opioïde delta de rat.....	63
Tableau 4 : Liste d'anticorps utilisés au cours de ma maîtrise.....	79

Liste des abréviations

BRET	Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence
Cdk5	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
CFA	Adjuvant complet de Freund (<i>Complete Freund's adjuvant</i>)
co-IP	Co-immunoprécipitation
COPI	<i>Coatomer complex I</i>
DOP	Récepteur opioïde delta (δ)
DRG	Ganglions rachidiens (<i>Dorsal root ganglia</i>)
DsiRNA	<i>Dicer-substrate short interfering RNA</i>
EBP50	<i>Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELM	<i>Eukaryotic linear motif</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GASP-1	<i>G protein-coupled receptor-associated sorting protein</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosine triphosphate
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney cells</i>
ICL2/ICL3	Deuxième/Troisième boucle intracellulaire
K164	Lysine-164 (du récepteur DOP)
KOP	Récepteur opioïde kappa (κ)
MOP	Récepteur opioïde mu (μ)
NHERF-1	<i>Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide sensitive factor</i>
p35	Activateur spécifique neuronal de Cdk5
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
SNX1	<i>Sorting nexin 1</i>
T161	Thréonine-161 (du récepteur DOP)

1. Introduction

1.1 La Douleur

1.1.1 Impact de la douleur sur la société

Selon l'Association Internationale de l'Étude sur la Douleur, la douleur est définie comme étant « une sensation et une expérience émotionnelle désagréable en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle ou décrites en ces termes » (International Association for the Study of Pain, IASP 2012 ; [https ://www.sfetd-douleur.org/definition](https://www.sfetd-douleur.org/definition)). Elle peut être séparée en deux types distincts de douleur, soit la douleur aiguë et la douleur chronique. Dans un premier temps, la douleur aiguë est vive et immédiate, caractérisée par une atteinte tissulaire brutale. Elle est souvent perçue comme un signal d'alarme pour l'organisme face à un stimulus mécanique, chimique ou thermique ou un mécanisme de défense du corps visant notre protection. On utilise souvent l'analogie d'une brûlure sur une surface chaude. Le fait que l'on retire notre main aussi rapidement en réponse à l'influx douloureux est le signal d'alarme. Puis, on a la douleur chronique, ou pathologique, qui est caractérisée par une douleur persistante ou récurrente qui perdure au-delà du temps habituel de guérison. La douleur chronique est un fléau de la société d'aujourd'hui, touchant plus d'une personne sur 3 au cours de leur vie en Amérique du Nord. De plus, les coûts estimés par la douleur chronique au Canada sont de plus de \$6 milliards par année tandis que les coûts indirects reliés à l'incapacité à travailler et aux journées de maladies sont de \$37 milliards annuellement (Lynch, 2011), ce qui représente plus que les coûts associés au cancer, aux maladies cardiovasculaires et au diabète combinés (Canadian Pain Society, 2010). Parmi les traitements les plus utilisés pour traiter la douleur on retrouve les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les antidépresseurs, les anticonvulsivants et les opioïdes.

1.1.2 Transmission de la douleur

Avant que le stimulus nociceptif ne soit perçu par le cerveau, il doit traverser plusieurs étapes au sein du corps humain (Yam et al., 2018). Tout d'abord, lorsqu'un stimulus nociceptif mécanique, thermique ou chimique survient, les cellules nerveuses, appelées nocicepteurs, seront stimulées. Lorsque la stimulation est suffisante pour générer un potentiel d'action, le signal sera transmis tout le long des afférences primaires vers la corne dorsale de

la moelle épinière. Il y a deux types de nocicepteurs, soit les fibres A δ et les fibres C, formant les afférences primaires (Basbaum et al., 2009). Les fibres A δ sont des petites fibres myélinisées qui transmettent une réponse rapide et localisée tandis que les fibres C, plus petites et non myélinisées, transmettent une réponse plus lente et diffuse. Les nocicepteurs relâcheront des neurotransmetteurs excitateurs tel la substance P ou le glutamate au niveau de la moelle épinière. Ces neurotransmetteurs activent des neurones de deuxième ordre appelés neurones de projection qui ont pour rôle de transmettre l'information vers le cerveau, au niveau du thalamus. L'information est ensuite acheminée au niveau du cortex somatosensoriel où le stimulus sera relayé via les neurones de troisième ordre à une zone du cortex selon la localisation du stimulus douloureux. Cette transmission du stimulus douloureux jusqu'au cerveau se nomme la voie ascendante. Ensuite, il y a la voie descendante qui a comme rôle de contrôler et inhiber le signal reçu par la voie ascendante (Ren and Dubner, 2002 ; Millan, 2002). Le signal inhibiteur débute son chemin en passant par les neurones dans la substance grise périaqueducale et le noyau raphé magnus du tronc cérébral jusqu'à un deuxième neurone, soit un neurone sérotoninergique/noradrénergique (5-HT/NA) (Suzuki et al., 2004). Le rôle de ce dernier est de contrôler et inhiber la communication entre les neurones de premier et deuxième ordre de la voie ascendante. Pour ce faire, les neurones 5-HT/NA vont relâcher leurs neurotransmetteurs dans la substance gélatineuse de la moelle épinière ce qui va, en premier lieu, inhiber la relâche de substance P des neurones pré-synaptiques et, en deuxième lieu, stimuler les interneurons qui relâcheront des enképhalines. Les enképhalines vont inhiber eux aussi la relâche de substance P des neurones pré-synaptiques et vont aussi inhiber les neurones post-synaptiques, ce qui va stopper la transmission du stimulus douloureux par la voie ascendante. Le message douloureux peut aussi être perçu de façon altérée. Ce phénomène peut être dû soit à l'hyperalgésie ou à l'allodynie (Jensen and Finnerup, 2014). Le premier est observé dans une situation où une sensation douloureuse est amplifiée au-delà du seuil normal de douleur. Dans le cas de l'allodynie, celle-ci est observée lorsque de la douleur est ressentie d'une sensation qui normalement n'aurait pas été douloureuse.

1.1.3 Traitement de la douleur

La douleur peut être traitée de différentes façons selon son intensité. Des douleurs plus faibles peuvent être soulagées à l'aide d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou des relaxants musculaires par exemple. Évidemment, le but est de soulager et nous permettre de supporter la douleur afin de continuer nos tâches quotidiennes. Par contre, lorsqu'elles sont insupportables et qu'on parle plutôt de douleurs modérées à sévères, les opioïdes appartiennent à la classe de médicaments la plus primée et la plus prescrite dans de telles situations (Choinière et al., 2009). Malheureusement, leur utilisation est accompagnée de plusieurs effets secondaires ainsi d'un haut risque de développer de la tolérance et de la dépendance. Selon l'échelle d'utilisation d'analgésiques de l'Organisation Mondiale de la Santé, des analgésiques non-opioïdiques comme l'aspirine ou des AINS sont utilisés lorsque la douleur apparaît (WHO's Cancer Pain Relief Ladder, 1986, <https://www.who.int/cancer/palliative/painladder/en/>). Puis, en ordre et en suivant la posologie à la lettre, si la douleur persiste ou augmente, l'utilisation d'opioïdes doux comme la codéine peut être nécessaire. Finalement, si la douleur est insupportable, la prise d'opioïdes puissants telle la morphine ou le fentanyl est souvent utilisée en milieu hospitalier par des professionnels de la santé pour soulager les patients.

1.2 Les Opioïdes

Les opioïdes proviennent de l'opium extrait des graines de pavot, processus utilisé depuis des milliers d'années pour traiter la toux, la diarrhée, la douleur et pour provoquer de l'euphorie, effet recherché par les consommateurs récréatifs (Lawler, 2018 : <https://www.sciencemag.org/news/2018/04/did-ancient-mesopotamians-get-high-near-eastern-rituals-may-have-included-opium>). Les opioïdes sont la classe de médicaments la plus utilisée en clinique pour traiter des douleurs modérées à sévères avec en tête de file des drogues telles le fentanyl et la morphine, qui est le traitement le plus utilisé. En 2016, on dénombrait 19 millions de prescriptions d'opioïdes faites au Canada (Beswick and Piccininni, 2018). Malheureusement, leur utilisation ne se fait pas toujours dans un environnement contrôlé et la prise d'opioïdes comme drogue récréative est de plus en plus populaire. Depuis quelques années déjà, le monde est plongé dans ce qu'on appelle maintenant la crise aux opioïdes. Cette crise grandissante affecte les personnes de tout âge

puisqu'on retrouve de plus en plus de traces d'opioïdes puissants dans les drogues de rue. Selon un rapport publié en 2017, on dénombrait 2816 décès reliés aux opioïdes en 2016 au Canada (*Apparent opioid-related deaths in Canada*, Gouvernement du Canada, 2018). La crise qui sévit avec violence aussi aux États-Unis leur aurait coûté, en 2015, \$504 milliards en fardeau économique total, c'est-à-dire les coûts directs ainsi que les journées maladies, perte d'emploi, etc. (Beswick and Piccininni, 2018). La prise d'opioïdes telle la morphine entraîne plusieurs effets secondaires comme entre autres la constipation, la confusion, l'euphorie (qui est l'effet recherché lors de la prise récréative), la dépression respiratoire (qui est l'effet responsable de la majorité des surdoses et des décès reliés aux opioïdes), haut risque de tolérance et dépendance (Schug et al., 1992). Par contre, lorsqu'utilisé selon la posologie prescrite par un spécialiste de la santé et lorsque nécessaire, les opioïdes permettent aux patients de soulager leur douleur sans avoir trop de conséquences. Plusieurs études se sont intéressées à la différence entre les sexes dans l'analgésie par les opioïdes considérant les différences hormonales entre les deux (Niesters et al., 2010 ; Zubieta et al., 2002). Par contre, les résultats sont assez mitigés puisque, dans le cas des opioïdes, il est surtout question de différences entre chaque individu, indépendamment du sexe, impliquant des dosages personnalisés selon la drogue et le patient (Kest et al., 2000).

1.3 Récepteurs aux opioïdes

1.3.1 Récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G, ou RCPG, sont une cible de choix dans le développement de médicaments et de loin la cible la plus étudiée. En effet, selon la *Food and Drug Administration* (FDA) en 2018, on dénombrait 475 drogues ciblant 108 différents RCPGs, ce qui représente environ le tiers (~34%) des drogues approuvées par la FDA (Hauser et al., 2018). Les récepteurs couplés aux protéines G appartiennent à la classe la plus large et diversifiée de récepteurs membranaires chez les eucaryotes. Ils sont formés de 7 domaines transmembranaires, comprenant 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires, ce qui permet l'activation de voies internes suite à la liaison de ligands. Suite à la liaison de ces molécules externes, un changement de conformation des RCPGs est observé ce qui permet l'interaction de ceux-ci avec des protéines G à proximité. Les protéines G sont des protéines capables de lier le GTP lorsqu'actives ou le GDP lorsqu'inactives. Les protéines G liant les

récepteurs couplés aux protéines G sont hétérotrimériques, ce qui signifie qu'elles sont formées de 3 sous-unités différentes, soit les sous-unités alpha, beta et gamma. Lorsqu'un récepteur n'est pas lié et donc qu'il n'y a pas de signal, la sous-unité alpha de la protéine G se lie au GDP. Ce complexe se lie ensuite au RCPG en attendant la liaison d'un ligand à celui-ci. Lorsqu'une molécule lie le récepteur, il y a ensuite activation de celui-ci, ce qui crée un changement de conformation qui va remplacer le GDP par un GTP. Le complexe précédemment formé de la GDP et de la sous-unité alpha se dissocie en deux, formant un complexe GTP-alpha et un dimère entre les deux autres sous-unités beta et gamma. Les protéines G demeurent actives jusqu'à ce que le GTP soit hydrolysé en GDP. Les voies de signalisation activées par ces protéines G dépendent du type de sous-unité alpha qui est activé tandis que le dimère beta et gamma peuvent à leur tour modifier l'activité de certains effecteurs tels l'adénylate cyclase, la voie des MAPK ou encore des canaux ioniques (Smrcka, 2008). Il existe 4 grandes familles de protéines G hétérotrimériques basées sur l'homologie de leurs sous-unités alpha, soit G_{as} , $G_{ai/o}$, $G_{aq/11}$ et $G_{\alpha12/13}$ (Neves et al., 2002 ; Wettschureck and Offermanns, 2005 ; Syrovatkina et al., 2016). La première, G_{as} , active des voies dépendantes à l'AMP cyclique en activant l'adénylate cyclase et des canaux ioniques calciques. $G_{ai/o}$ a quant à elle un effet inverse, soit l'inhibition des voies AMP cyclique dépendantes en inhibant l'adénylate cyclase et activant des canaux ioniques potassiques. $G_{aq/11}$ active la phospholipase C- β , ce qui active les voies de signalisation du calcium et de la protéine kinase C. Finalement, $G_{\alpha12/13}$ crée un lien entre les RCPGs et les facteurs GEF pour les petites GTPases Rho et sont impliquées dans la régulation de l'actine du cytosquelette. Les récepteurs couplés aux protéines G sont classés dans différentes classes selon leur séquence et leur fonction (Attwood and Findlay, 1994 ; Kolakowski, 1994). Les récepteurs sont compris dans 7 groupes différents (A, B, C, D, E et F), avec les groupes A et B étant les plus communs. Les RCPGs de classe A sont de la famille de la rhodopsine, communément appelée *rhodopsin-like* dû à leur homologie de structure primaire avec celui-ci. Il s'agit de la plus grande famille de récepteurs répertoriant environ 80% des RCPGs et inclue entre autres des hormones, neurotransmetteurs et des récepteurs à la lumière (Hu et al., 2017). Puis, les RCPGs de la famille B de type sécrétine comprennent des récepteurs hormonaux polypeptidergiques, tel le récepteur à la sécrétine, des molécules qui médient les interactions au niveau de la membrane plasmique, comme CD97, ainsi que des protéines

régulatrices de la *Drosophila* (Harmar, 2001). Ensuite, la famille C des RCPGs, qui comprend le récepteur au glutamate (mGlu), possède une portion N-terminale typique permettant la liaison d'agonistes ainsi que de modulateurs allostériques (Chun et al., 2012). Les familles D (phéromones chez les levures) et E (récepteurs à l'AMPc) ne sont pas présents chez l'humain et F (*frizzled and smoothened*) est impliqué lors de l'embryogénèse (Lagerström and Schiöth, 2008 ; Wang et al., 2013). Les récepteurs opioïdes font tous partie de la famille A des RCPGs et activent tous la protéine $G_{i/o}$. Il existe 3 types de récepteurs opioïdes : le récepteur mu (μ), le récepteur delta (δ) et le récepteur kappa (κ). Les prochaines sections entreront plus en détails sur le fait que chaque type de récepteur possède ses propres ligands, fonctions et son lot d'effets secondaires.

1.3.2 Les récepteurs opioïdes

L'identification des récepteurs opioïdes par des lettres grecques a été attribué lors de leur découverte. Pour le récepteur mu (μ), cela vient de « Morpheus », dieu des rêves dû à ses effets euphoriques (Pradhan et al., 2012). Pour le récepteur kappa (κ), cela provient plutôt du premier ligand qui a permis sa découverte, soit la ketocyclazocine. Finalement, le récepteur delta (δ) pour *vas deferens*, où il a été localisé (Lord et al., 1977). Les trois récepteurs opioïdes sont tous des récepteurs couplés aux protéines G, plus spécifiquement les protéines G inhibitrices ($G_{i/o}$) (Al-Hasani and Bruchas, 2011). L'activation de ces récepteurs par des ligands spécifiques va causer une fermeture des canaux calciques voltage dépendant, stimuler l'efflux de potassium, causant une hyperpolarisation de la membrane, et finalement réduire la production d'AMP cyclique via une inhibition de l'adénylate cyclase (Law et al., 2000 ; Watts and Neve, 2005). Ces récepteurs ont aussi des ligands naturels qui leur est propres. Par exemple, pour le récepteur mu (MOP), c'est l'endorphine, pour le récepteur delta (DOP), c'est l'enképhaline, et pour le récepteur kappa (KOP), c'est la dynorphine (Holden et al., 2005). Ils ont aussi des ligands exogènes non-naturels qui leur sont spécifiques telle la morphine pour le MOP, la ketocyclazocine pour le KOP ainsi que la deltorphine ou le DADLE pour le DOP. Ces récepteurs, lorsque liés par un ligand, sont activés créant ainsi un changement de conformation du récepteur, ce qui activera leurs protéines G inhibitrices et causera une inhibition de l'AMP cyclique. Les récepteurs sont ensuite phosphorylés par des protéines G kinases (GRKs), ce qui permet le recrutement des β -arrestines qui permettront

aux récepteurs d'être internalisés (Lefkowitz, 2004). Ensuite, les récepteurs opioïdes internalisés retourneront soit à la surface de la cellule via la voie de recyclage ou bien seront dégradés en étant envoyés vers les lysosomes pour leur dégradation (Al-Hasani and Bruchas, 2011). Comme mentionné plus tôt, chaque type de récepteurs aux opioïdes possède ses propres ligands ainsi que ses propres effets secondaires. Nous allons donc survoler chacun des trois récepteurs principaux. Chaque récepteur opioïde, une fois activé par des ligands, montre un certain potentiel analgésique, mais aussi plusieurs effets secondaires.

1.3.2.1 Le récepteur opioïde mu (MOP)

Tout d'abord, le récepteur opioïde mu (MOP) est celui le plus ciblé par les agonistes en clinique présentement avec les plus connus étant la morphine, la codéine, l'hydromorphone, la méthadone et le fentanyl. Bien que ces agonistes permettent une excellente analgésie chez les patients dans le traitement de la douleur, ils sont aussi associés à plusieurs effets secondaires indésirables. En effet, parmi ces effets on retrouve la constipation, les nausées, la dépression respiratoire (responsable de la majorité des morts associés aux opioïdes) en plus d'un haut risque de développer de la tolérance et de la dépendance envers ceux-ci (Bader et al., 2011 ; Morgan and Christie, 2011). Une étude effectuée sur des modèles de souris transgéniques a aussi démontré que les effets désirés et indésirés étaient tous deux reliés au récepteur MOP (Charbogne et al., 2014). Les ligands du récepteur MOP procurent aussi de l'euphorie et des hallucinations, faisant de ces drogues des choix populaires dans les drogues de rue. En effet, les opioïdes les plus puissants utilisés comme drogues de rue comme la morphine, l'héroïne et le fentanyl, qui est 100 fois plus puissant que la morphine, lient le récepteur MOP. En cas de surdose, un antagoniste, la naloxone, ayant une forte affinité pour le récepteur MOP est donné pour compétitionner l'effet des agonistes et ultimement sauver des vies. Ce récepteur est donc directement impliqué dans la crise des opioïdes qui sévit présentement et l'urgence de développer de nouveaux ligands moins dangereux et tout aussi efficaces devient donc une priorité ou voire même d'étudier de nouvelles alternatives, telles les récepteurs opioïdes kappa et delta.

1.3.2.2 Le récepteur opioïde kappa (KOP)

Ce récepteur est peu utilisé en clinique, mais par contre très étudié en recherche. Des études sur les agonistes du récepteur KOP ont montré que le récepteur avait un bon potentiel analgésique en plus d'éviter les effets indésirables associés aux agonistes du récepteur MOP, faisant du KOP une bonne alternative dans le développement de nouveaux traitements contre la douleur (Pfeiffer et al., 1986). En effet, les agonistes du KOP ne montrent pas de signe de dépendance ou de dépression respiratoire. Par contre, un des effets secondaires de ceux-ci est qu'ils sont psychotomimétiques, c'est-à-dire qu'ils simulent l'effet d'une psychose et causent de la dysphorie, ce qui est l'inverse de l'euphorie (Bruchas and Chavkin, 2010). Malgré les effets inverses des agonistes du récepteur kappa et mu, un mélange des deux pourrait être une solution pour le traitement de la douleur (Minervini et al., 2018). En effet, l'analgésie couplée au faible risque d'abus des agonistes kappa, ajouté à cela l'efficacité connue des agonistes mu déjà utilisés en clinique à un ratio permettant de diminuer le plus possible les effets indésirables des deux récepteurs, et on obtiendrait potentiellement un nouveau traitement efficace. Bien que la co-thérapie soit une option, la prise de plusieurs médicaments en même temps peut entraîner d'autres complications, faisant en sorte qu'une drogue ciblant qu'un seul récepteur avec que des bénéfices demeure l'option par excellence.

1.3.2.3 Le récepteur opioïde delta (DOP)

Le troisième type de récepteurs aux opioïdes, le récepteur opioïde delta (DOP), est une cible de choix pour le développement de nouveaux analgésiques comparativement à ses homologues. Sa séquence a été premièrement identifiée lors d'un dépistage dans des cellules COS à l'aide d'un analogue du peptide opioïdergique enképhaline puis son ADN cloné (Evans et al., 1992 ; Kieffer et al., 1992). Le récepteur DOP est distribué majoritairement dans la partie rostrale du cerveau ainsi que dans la moelle épinière et dans les neurones des ganglions rachidiens (DRG) (Mennicken et al., 2003). Bien qu'il ne soit pas ciblé par aucun traitement actuellement sur le marché, plusieurs de ses agonistes se sont montrés prometteurs dans le traitement de la douleur chronique ainsi que des troubles émotionnels et neurologiques (Pradhan et al., 2011). En effet, la délétion du DOP (Filliol et al., 2000) ainsi que l'utilisation d'un antagoniste du DOP, le naltrindole (Perrine et al., 2006) augmentent les niveaux d'anxiété et de comportements associés à la dépression. Malgré une faible efficacité

in vivo, les agonistes DOP ont quand même un certain potentiel analgésique lorsque utilisés sous diverses conditions, tels qu'un traitement par la morphine ou en présence d'inflammation, principes qui seront abordés dans de prochaines sections. Par contre, leur faible efficacité entraîne l'utilisation de plus fortes doses, ce qui cause des effets indésirables comme des convulsions, principalement causées par les agonistes delta non-peptidergiques avec un benzamide dans leur structure, tel le SNC80 (Danielsson et al., 2006 ; Shiwerski et al., 2017). Malgré tout, le DOP demeure prometteur en tant qu'alternative vis-à-vis le MOP et ses effets secondaires.

1.4 Le DOP : une cible de choix pour le traitement de la douleur

Les agonistes du DOP ont montré, en plus d'une certaine efficacité analgésique (Kieffer and Gavériaux-Ruff, 2002), des effets secondaires moindres comparé aux agonistes du récepteur MOP. Que ce soit au niveau de la dépression respiratoire (Cheng et al., 1993 ; Gallantine and Meert, 2005), de la constipation (Gallantine and Meert, 2005 ; Feng et al., 2006) ou le risque de dépendance (Cowan et al., 1988 ; Codd et al., 2009), le profil du DOP en fait une cible avantageuse. Par contre, les récepteurs DOP ont des effets très modestes au niveau de l'analgésie et de la récompense (Cahill et al., 2007 ; Pradhan et al., 2011), ce qui pourrait être dû au fait qu'une particularité des récepteurs DOP est qu'il est localisé de façon peu commune comparée à la grande majorité des RCPGs. En effet, les récepteurs DOP sont majoritairement intracellulaires alors qu'une faible quantité est exprimée à la membrane plasmique des neurones (Zhang et al., 1998 ; Petaja-Repo et al., 2000 ; Cahill et al., 2001 ; Gendron et al., 2006). Afin de mieux comprendre comment agit le récepteur opioïde delta dans de telles conditions, nous allons survoler brièvement ses caractéristiques.

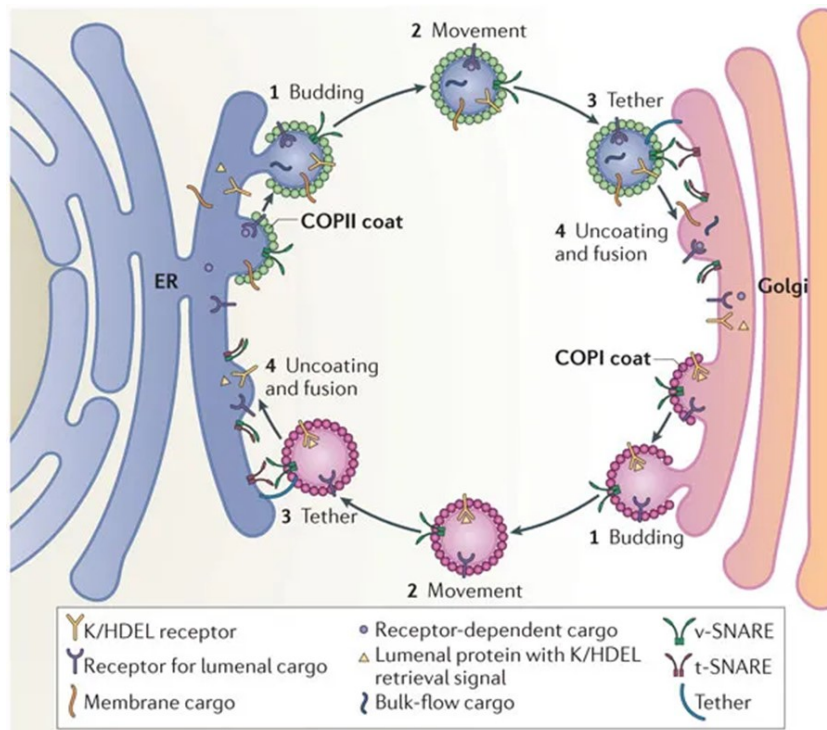
1.4.1 Distribution du DOP

Une étude s'est intéressée à la distribution du DOP chez différentes espèces dans la moelle épinière et les ganglions rachidiens de la corne dorsale (DRG) (Mennicken et al., 2003). En utilisant l'autoradiographie des récepteurs DOP liés par de la deltorphine II radiomarkée à l'iode-125, ils ont observé un marquage chez les rats et les souris principalement dans la matière grise contrairement à la moelle épinière de singe et surtout d'humain où on observait un marquage surtout dans les couches superficielles (laminae I-II).

Le marquage observé chez les espèces supérieures porte à croire que les récepteurs DOP proviennent essentiellement des afférences primaires, soit des DRGs, puisqu'ils ont aussi étudié la distribution de l'ARN messager chez ces différentes espèces et que l'on ne retrouve aucun marquage dans la moelle épinière chez l'humain, contrairement aux autres espèces où l'on observe plutôt un marquage bien distribué dans la totalité de la matière grise (Mennicken et al., 2003).

1.4.2 Trafic des RCPGs

Comme mentionné précédemment, les récepteurs DOP sont majoritairement localisés à l'intérieur de la cellule, diminuant grandement sa biodisponibilité pour ses ligands. Bien que peu commun chez les récepteurs couplés aux protéines G de cette famille, il existe tout de même d'autres RCPGs qui sont principalement localisés dans les compartiments intracellulaires : le récepteur à la nociceptine, dopamine type 1, neurotensine type 2 et *protease-activated receptor* (PAR) 2 en sont des exemples. Tout comme le DOP, ils peuvent tous être recrutés des sites intracellulaires vers la membrane plasmique sous certaines conditions. La majorité des récepteurs couplés aux protéines G nouvellement synthétisés sont triés, puis dégradés ou envoyés du réticulum endoplasmique au Golgi. Le modèle général du trafic d'un RCPG débute au niveau du réticulum endoplasmique (RE) où les récepteurs nouvellement synthétisés sont repliés correctement par entre autres des protéines chaperonnes. À leur sortie du RE, les RCPGs se déplacent vers l'appareil de Golgi où ils seront modifiés avant d'être envoyés constitutivement vers la membrane plasmique via des vésicules de transport (Drake et al., 2006). Ce transport est assuré par des complexes de protéines cargo nommées COPI et COPII (coat protein complex). COPI est responsable du transport rétrograde du Golgi vers le réticulum endoplasmique tandis que COPII facilite l'export des protéines vers le Golgi avec le transport antérograde (figure 1) (Brandizzi and Barlowe, 2013). Évidemment, des erreurs à une ou l'autre de ces étapes de maturation, par exemple un mauvais repliement du récepteur, enverront les récepteurs immatures vers la voie de dégradation. Le trafic du récepteur opioïde delta diffère quelque peu de celui d'un RCPG typique.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 1 : Transport bidirectionnel entre le réticulum endoplasmique et le Golgi. Ces processus requièrent le bourgeonnement (1), le transport (2), l'attachement (3) ainsi que le déshabillage et la fusion (4) des complexes COPI et COPII avec leurs compartiments respectifs, soit le Golgi ou le RE. (Figure tirée de Brandizzi and Barlowe, 2013 ; utilisée avec permission)

1.4.3 Trafic du DOP

La majorité des études sur le trafic des RCPGs se concentrent principalement sur ce qui advient des récepteurs une fois liés par leurs agonistes, phosphorylés puis internalisés. Dans le cas du DOP ainsi que certains autres RCPGs, tel le récepteur à la dopamine de type 1 (Brismar et al., 1998), ils sont localisés principalement au niveau intracellulaire dans des larges vésicules à corps dense (LDCVs ; *large dense-core vesicles*) en attente d'un signal pour être envoyés à la surface de la cellule. Le DOP, une fois synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique, est envoyé vers le Golgi via le complexe COPII où il subira des modifications post-traductionnelles telle la glycosylation afin de murer (figure 2 ; Cahill et al., 2007). Les récepteurs DOP matures sont ensuite contenus dans des larges vésicules à corps dense (LDCV) pour être transportés et insérés de façon régulée ou constitutive vers la membrane plasmique où il sera fonctionnel (Cahill et al., 2007). Une fois stimulé par son ligand, le DOP est internalisé dans les endosomes précoces où il peut être soit envoyé vers

les lysosomes pour être dégradé, ou envoyé vers les endosomes tardifs pour être recyclé à la membrane selon les besoins. L'intérêt autour des études sur le récepteur opioïde delta (DOP) réside surtout dans le fait que celui-ci montre moins d'effets secondaires et de potentiel d'abus que les traitements présentement utilisés en clinique ciblant le récepteur opioïde mu (MOP). Le problème tel que mentionné auparavant est que la faible expression membranaire des récepteurs DOP est associée à un faible potentiel analgésique et donc une efficacité moindre des agonistes DOP vis-à-vis les agonistes du MOP. Par contre, plusieurs études ont montré différents mécanismes et traitements pouvant réguler le nombre de récepteurs DOP exprimés à la surface de la cellule.

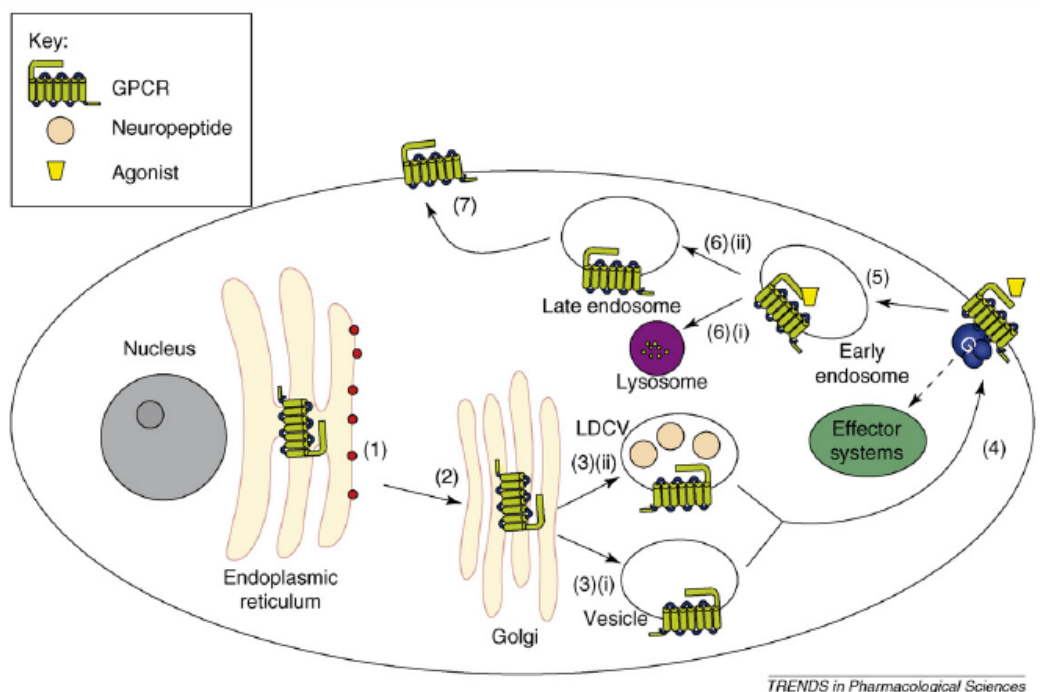


Figure 2 : Trafic d'un récepteur couplé aux protéines G de sa synthèse à son export vers la membrane plasmique. 1) Le RCPG est synthétisé et assemblé au niveau du réticulum endoplasmique. 2) Les récepteurs migrent ensuite vers l'appareil du Golgi. 3) Les récepteurs sont dirigés dans des larges vésicules à corps dense pour être transportés et insérés dans la membrane plasmique de façon constitutive (i) ou régulée (ii). 4) Fusion de la vésicule à la membrane plasmique où le récepteur est fonctionnel. 5) Après la stimulation par un ligand, les récepteurs sont internalisés et envoyés dans des endosomes précoces. 6) Les récepteurs sont ensuite triés vers les lysosomes pour être dégradés (i) ou vers les endosomes tardifs (ii) afin d'être recyclés vers la membrane plasmique. (Tirée de Cahill et al., 2007 avec permission)

1.4.4 Modulation de l'expression membranaire du DOP

1.4.4.1 Morphine chronique

De nombreuses études ont démontré que l'on pouvait augmenter le nombre de récepteurs DOP exprimés à la surface de la cellule et ainsi augmenter l'analgésie de ses agonistes. En effet, un traitement prolongé de doses croissantes de morphine pendant 48 heures sur des neurones corticaux en culture primaire a montré une augmentation du nombre de DOP à la surface des cellules causant du même coup une augmentation significative de l'internalisation de la deltorphine, un agoniste sélectif du DOP (Cahill et al., 2001 ; Lucido et al., 2005 ; Gendron et al., 2006 ; Pradhan et al., 2006) (figure 3). Évidemment, comme mentionné plus tôt, cette augmentation de récepteurs DOP à la membrane par des traitements à la morphine, méthadone ou étorphine, est aussi associée à une augmentation de l'analgésie causée par les agonistes delta tel la deltorphine (Morinville et al., 2003). Cette même augmentation est aussi observée dans le cas du fentanyl, un puissant agoniste du MOP, lorsque celui-ci est administré de façon continue à l'aide de pompes pendant 48 heures, mais pas lors de traitements intermittents (Morinville et al., 2003). Un point intéressant de cette étude est qu'un traitement prolongé à la morphine sur des souris où le gène du récepteur MOP est « knock-out » n'a eu aucun effet sur le nombre de récepteurs DOP exprimés à la membrane plasmique, signifiant que cet effet est associé à l'activation du MOP par la morphine et non qu'au traitement à la morphine seul. On sait aussi que les récepteurs DOP exprimés dans la corne dorsale de la moelle épinière proviendraient des afférences primaires et qu'un traitement à la morphine augmente les agonistes DOP internalisés. Une étude a supporté ces faits en effectuant une rhizotomie unilatérale dorsale, c'est-à-dire couper les nerfs sensitifs d'un seul côté et les comparer au côté controlatéral qui n'a pas été touché (Morinville et al., 2004a). En effet, après un traitement à la morphine, il n'y avait pas d'augmentation de deltorphine internalisée du côté ayant reçu la chirurgie, supportant du même coup l'importance des afférences primaires dans ce mécanisme de modulation du trafic du DOP suite à un traitement à la morphine.

1.4.4.2 Inflammation chronique

Une autre situation où une augmentation de la densité de récepteurs opioïdes delta à la membrane a été observée est dans des conditions d'inflammation chronique (figure 3). En effet, une injection de l'adjuvant complet de Freund (CFA) de façon intraplantaire dans la patte de rats pendant 72 heures, créant ainsi un modèle d'inflammation chronique, a montré une augmentation de récepteurs DOP à la membrane plasmique des neurones dans la corne dorsale de la moelle épinière (Cahill et al., 2003). Tout comme avec le traitement prolongé à la morphine, on observe aussi une augmentation de l'efficacité des agonistes du DOP (Fraser et al., 2000). De plus, l'implication du récepteur opioïde mu en cas d'inflammation chronique semble encore une fois importante pour que les récepteurs DOP soient plus exprimés à la membrane et que ses agonistes montrent une meilleure analgésie. En effet, le récepteur MOP est nécessaire pour que le trafic des récepteurs DOP vers la membrane augmente (Morinville et al., 2004b) ainsi que pour l'anti-hyperalgésie des agonistes DOP donnés en concomitance ou non avec des agonistes MOP en cas d'inflammation chronique (Qiu et al., 2000 ; Gendron et al., 2007a, 2007b, 2010). S'il y a différentes manières de moduler le trafic du DOP et d'augmenter ses niveaux d'expression à la membrane plasmique, quelques questions demeurent. En particulier, quels sont les partenaires protéiques impliqués dans ce trafic vers la surface et pourrait-on cibler ces partenaires en condition normale afin d'obtenir le même résultat?

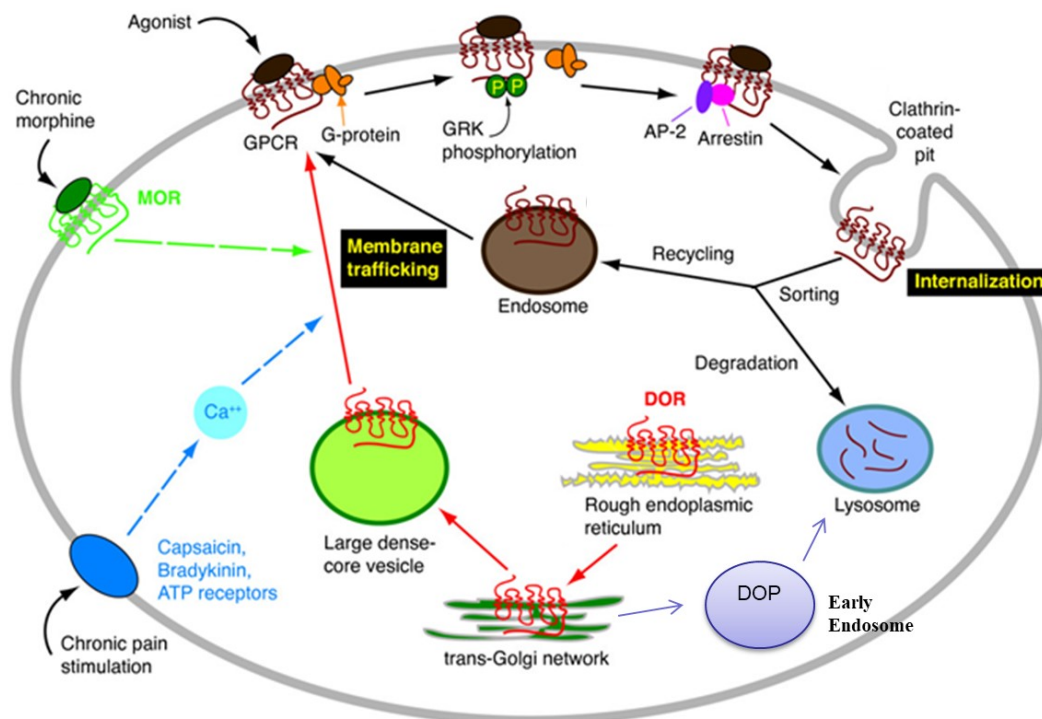


Figure 3 : Mécanismes du trafic membranaire du récepteur opioïde delta (DOP). Les récepteurs une fois liés par un agoniste sont phosphorylés par les GRKs puis liés aux protéines AP-2 et arrestine pour être internalisés via endocytose dans des vésicules de clathrine. Une fois internalisés, les RCPGs sont triés soit vers les lysosomes pour être dégradés ou vers les endosomes pour être recyclés à la membrane. De l'autre côté, les récepteurs nouvellement synthétisés par le réticulum endoplasmique sont transportés vers le réseau trans-Golgi afin de maturer. Puis, les RCPGs sont envoyés soit vers les endosomes précoces pour être dégradés ou bien dans les grandes vésicules à corps dense où les récepteurs opioïdes delta résident en attendant d'être appelés à la membrane. Des processus tels que l'inflammation ou un traitement prolongé à la morphine viennent influencer sur l'export à la membrane des réserves intracellulaires de DOP. (tirée de Bie et al., 2007 ; reproduite et modifiée avec permission)

1.5 Partenaires d'interaction du récepteur opioïde delta

1.5.1 Interaction du DOP avec les protéines de triage endosomal

Bien que des traitements tels que la morphine et l'inflammation chronique ont permis d'observer une augmentation des récepteurs DOP à la surface, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans ce changement de localisation demeurent assez nébuleux. Plusieurs groupes ont identifié des partenaires potentiels ayant un rôle dans la régulation du trafic du DOP. Afin d'identifier des protéines potentielles, le groupe de Heydorn *et al* a utilisé la queue C-terminale de 59 RCPGs, dont le récepteur opioïde delta, fusionnées à la protéine de fusion GST et ont vérifié les interactions de celles-ci avec 4 protéines adaptatrices

impliquées dans le triage endosomal des récepteurs, soit *G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1* (GASP-1), *Sorting nexin 1* (SNX1), *Na⁺/H⁺-Exchanger Regulatory Factor* (NHERF-1) et *N-ethylmaleimide sensitive fusion protein* (NSF) (Heydorn et al., 2004). Parmi ces protéines, GASP-1 et SNX1 seraient impliquées dans la voie de dégradation des récepteurs via les lysosomes tandis que NSF et NHERF-1 seraient plutôt impliquées dans le recyclage des récepteurs vers la surface de la cellule.

1.5.1.1 G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP-1)

La première protéine vient de la famille des GASP, c'est-à-dire « *G protein-coupled receptor-associated sorting protein* », avec comme membre le plus étudié et étant le seul interagissant avec DOP, la protéine GASP-1 (ou GPRASP-1). Elle est exprimée dans le système nerveux, principalement au niveau de l'amygdale, le striatum, l'hippocampe et le thalamus (Simonin et al., 2004). GASP-1 interagit avec le récepteur DOP principalement via sa portion C-terminale et se lie au domaine C-terminal du DOP (Bornert et al., 2013). Cette protéine a été identifiée pour la première fois en utilisant la queue C-terminale du récepteur DOP comme appât dans la technique double hybride servant à identifier des interactions protéines-protéines (Whistler et al., 2002). Le site précis d'interaction de GASP-1 sur le DOP demeure inconnu, mais GASP-1 semble interagir via les 50 derniers acides aminés de sa séquence en C-terminale, lui permettant d'interagir avec la queue C-terminale du DOP (Whistler et al., 2002). Le principe par lequel GASP-1 dirigerait les récepteurs DOP vers les lysosomes pour la dégradation passerait par la machinerie ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*), complexe qui trie les récepteurs dans des vésicules intraluminales formant les corps multivésiculaires (MVBs ; multivesicular bodies), les menant à être dégradés au niveau des lysosomes (Dores and Trejo, 2014 ; Rosciglione et al., 2014). En effet, GASP-1 en collaboration avec la protéine cytoplasmique accessoire *dysbindin*, impliquée dans la formation d'organelles spécialisées reliées aux lysosomes, permettrait la liaison de RCPGs tels le DOP et le récepteur dopaminergique de type 2 (D2R) à la composante de la machinerie ESCRT, HRS, et ce indépendamment de l'ubiquitination (Rosciglione et al., 2014). GASP-1 et ses partenaires (*dysbindin* et HRS) forment le complexe GASP qui a pour rôle de retenir l'entrée des récepteurs DOP et dopaminergiques de type II (D2) internalisés dans la voie du recyclage en les gardant au niveau de la membrane

limitante des endosomes et donc de moduler leur trafic vers les lysosomes pour leur dégradation (Marley and von Zastrow, 2010). Ces études démontrent que le DOP possède une certaine flexibilité quant au temps passé dans les endosomes avant d'être envoyés vers les lysosomes, ce qui augmente le potentiel de la machinerie de GASP comme étant une cible pharmacologique de choix sur la modulation de DOP.

1.5.1.2 Sorting Nexin 1 (SNX1)

La deuxième protéine identifiée est SNX1, ou *Sorting nexin 1* a été montrée pour interagir directement avec la queue C-terminale du DOP, sans toutefois indiquer de fonction précise de celle-ci (Heydorn et al., 2004). Elle a été montrée comme ayant un rôle dans la voie lysosomale avec les récepteurs PAR1 (*Protease-activated receptor-1*) et à l'EGF (*Epidermal growth factor*) (Kurten et al., 1996 ; Wang et al., 2002). SNX1 serait aussi impliquée dans le triage au niveau des endosomes vers les lysosomes des récepteurs localisés à la surface des cellules comme par exemple PAR1 (Gullapalli et al., 2006). Cette protéine possède un domaine de liaison phospholipidique (domaine PX) qui permet à SNX1 de se lier à PI3P dans les endosomes pour permettre le triage vers la voie lysosomale. Dans le cas du récepteur à l'EGF, son triage vers la voie lysosomale requiert une interaction dépendante de l'ubiquitination du récepteur avec HRS (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), clathrine et Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*). Alors que la clathrine est impliquée dans la formation de vésicules tels les endosomes précoces, Tsg101 et HRS sont des composantes importantes dans la régulation de la signalisation des récepteurs à la surface des cellules. Tsg101 a principalement un rôle dans le triage des protéines endocytosées tandis que HRS s'associe à la surface des endosomes précoces et serait impliqué aussi dans le triage des protéines ubiquitinées vers ces mêmes endosomes (Lu et al., 2003). Par contre, dans le cas du récepteur PAR1, il a été montré que HRS et Tsg101 ne sont pas requis pour la dégradation des récepteurs (Gullapalli et al., 2006). Fait intéressant, le récepteur opioïde delta nécessite HRS, mais pas nécessairement Tsg101 pour être dégradé, supportant du même coup une possible implication de SNX1 dans sa dégradation (Hislop et al., 2004).

1.5.1.3 Protéines de triage endosomal impliquées dans l'adressage du DOP à la membrane : NSF et NHERF-1

Tout d'abord, *N-ethylmaleimide sensitive fusion protein* (NSF) serait impliquée dans l'adressage membranaire du DOP au niveau de sa fusion à la membrane. C'est une protéine exprimée de façon ubiquitaire dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. NSF se fixerait via la protéine adaptatrice SNAP (*Soluble NSF attachment proteins*) aux protéines de fusion SNARE (SNAP *receptors*), qui sont responsables de la fusion et du trafic membranaire. Le complexe NSF-SNAP faciliterait la dissociation du complexe SNARE après la fusion entre deux membranes grâce à l'activité ATPase de NSF et à la synaptotagmin, protéine qui détecterait les niveaux de calcium dans le but de promouvoir la fusion vésiculaire (Furst et al., 2003 ; Marchese et al., 2003 ; Südhof, 2013). Le complexe SNARE est composé de plusieurs protéines, soit la *synaptobrevin* (aussi appelée VAMP) située au niveau des membranes des vésicules de clathrine, puis de la *syntaxin* et SNAP-25 au niveau de la membrane de la cellule (Südhof and Rothman, 2009). Une autre étude a aussi montré que NSF pourrait avoir un rôle avec la protéine kinase C sur la régulation et la désensibilisation du récepteur GABA_B (Pontier et al., 2006).

La deuxième protéine impliquée dans le recyclage à la membrane du DOP est Na⁺/H⁺-Exchanger Regulatory Factor (NHERF-1), aussi appelé EBP50 (Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50). Elle a été montrée comme interagissant avec les récepteurs opioïde kappa et β₂-adrénergique via les 2 domaines PDZ (PSD95/Dlg1/zo-1) de NHERF-1 qui lient la queue C-terminale de ces récepteurs. NHERF-1 interagirait aussi avec le DOP de façon indirecte via NGF, mais avec une affinité plus faible qu'avec KOP (Huang et al., 2004). Son rôle avec le récepteur β₂AR est principalement au niveau de l'échange des ions Na⁺/H⁺ (Hall et al., 1998a, 1998b). NHERF-1 possède aussi un domaine ERM (erzin/radixin/moesin) qui interagit avec l'actine du cytosquelette intracellulaire et permet l'interaction de NHERF-1 avec des protéines intégrales de la membrane plasmique. Son rôle avec le récepteur opioïde kappa (KOP) touche aussi à la facilitation des échanges Na⁺/H⁺ (Huang et al., 2004), mais aussi au niveau du recyclage du récepteur KOP en bloquant sa baisse de régulation (down-regulation), augmentant ainsi son recyclage à la membrane (Li et al., 2002). L'implication des protéines NSF et NHERF-1 avec le récepteur DOP n'étant toujours pas élucidée, le

groupe de Bie *et al* a proposé une hypothèse très intéressante qui concorde avec ce que l'on croyait au départ, c'est-à-dire que ces 2 protéines entreraient en jeu principalement en situation de traitement à la morphine ou d'inflammation. Dans ce cas-ci, l'étude s'est intéressée au DOP en condition de morphine chronique (Bie et al., 2010). Un traitement prolongé à la morphine régulerait à la hausse (*upregulates*) le facteur de croissance des nerfs (NGF) ce qui activerait le récepteur TrkA du NGF et, via l'activation des voies de signalisation de PLC γ et PI3K, on observerait une hausse de relâche du calcium intracellulaire. Cette hausse provoquerait, par des mécanismes toujours inconnus, des changements d'expression du DOP, qui était maintenu intracellulaire et maintenant phosphorylé par la CaMKII, et de NHERF-1, provoquant une interaction entre NHERF-1 et le DOP phosphorylé. Le DOP migrerait ensuite vers la membrane pour interagir avec le complexe SNARE, qui est régulé par NSF, pour finalement fusionner avec la membrane et être exprimé à la surface (Bie et al., 2010).

1.5.2 Coat protein complex 1 (COPI)

Un autre partenaire impliqué directement dans le trafic du récepteur DOP est COPI (*coat protein complex 1*). Principalement impliqué dans le transport rétrograde (figure 1) des protéines résidentes du Golgi vers le réticulum endoplasmique, le complexe vésiculaire COPI est formé par des coatomères COP et possède 7 sous-unités (Styers et al., 2008 ; Popoff et al., 2011 ; Jackson, 2014) (figure 3). Le complexe COPI reconnaît des motifs di-lysine ou di-arginine (KxK ; RxR ; KxR ; RxK) principalement au niveau des queues C-terminales de protéines membranaires (Ma and Goldberg, 2013). COPI a été montrée comme pouvant lier plusieurs récepteurs, dont le récepteur opioïde kappa (Li et al., 2012). Les motifs di-lysine sont surtout situés au niveau de la queue C-terminale tandis que les motifs di-arginine peuvent être retrouvés dans n'importe quels domaines intracellulaires. Une étude menée par notre laboratoire visant à identifier des partenaires potentiels du DOP à l'aide de la spectrométrie de masse sur cellules HEK293 a trouvé 6 des 7 sous-unités du complexe COPI (COPA, COPB1, COPB2, ARCN1, COPE, COPG1, COPG2) (St-Louis et al., 2017). Une analyse de la séquence du DOP a révélé 13 sites de liaison potentiels parmi les différents domaines intracellulaires du DOP (figure 5, acides aminés en gris). L'étude de St-Louis *et al* a permis de valider l'interaction entre le complexe COPI, via sa sous-unité β -COP, avec le

DOP et que celle-ci contribuerait possiblement à la rétention du DOP au niveau du Golgi et du RE (St-Louis et al., 2017 ; Michelsen et al., 2005). En effet, à l'aide d'ELISA de surface, l'expression de surface du DOP a été significativement augmentée lorsque les sites de liaison K164-K166A et K250-252A au niveau des deuxième et troisième boucle intracellulaire du DOP étaient mutés, validant possiblement le rôle de COPI dans la rétention du DOP (St-Louis et al., 2017). D'autres motifs pourraient aussi avoir un rôle dans la régulation du DOP. En effet, le groupe du Pr Puthenveedu a montré que des motifs di-arginine (RxR) au niveau de la queue C-terminale du DOP interagissaient avec le complexe COPI pour retenir le DOP au niveau du Golgi, via une régulation médiée par NGF (*nerve growth factor*) (Shiwarski et al., 2019).

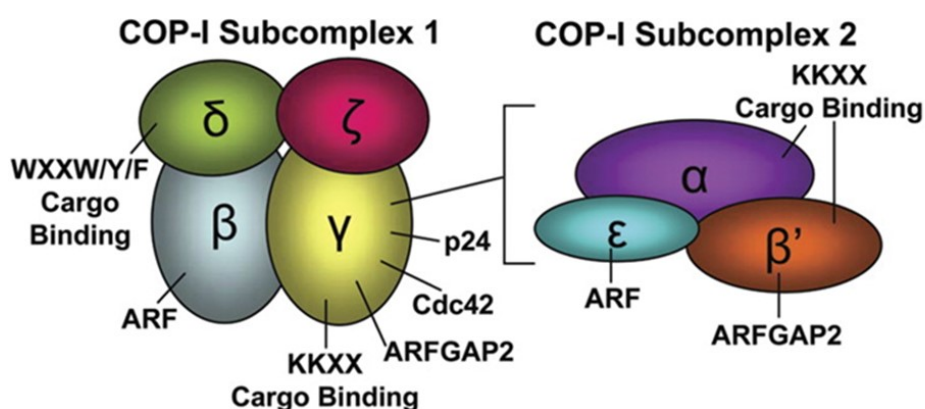


Figure 4 : Schéma de l'arrangement des sous-unités des sous-complexes 1 et 2 du complexe COPI. (reproduite avec permission, tirée de Styers et al., 2008)

1.5.3 Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)

En plus des mécanismes de modulation tels un traitement à la morphine et de l'inflammation chronique induite par le CFA, un autre mécanisme qui pourrait être impliqué dans la régulation de la localisation des récepteurs DOP est la phosphorylation. Un des partenaires potentiels impliqués dans le trafic du DOP et aussi connu pour le phosphoryler est la *cyclin-dependent kinase 5* (Cdk5). Cdk5 est un membre de la famille des Cdk, mais contrairement aux autres Cdk, elle n'est pas impliquée dans la progression du cycle cellulaire. Cette kinase sérine/thréonine omniprésente est plutôt impliquée dans différents processus neuronaux tels l'activité neuronale, la migration neuronale et la croissance des neurites. Elle est fortement exprimée dans les neurones post-mitotiques où elle est localisée

dans le cytoplasme (Lee et al., 1996 ; Smith and Tsai, 2002 ; Jeong et al., 2013). Cdk5 phosphoryle une séquence consensus ((S/T) PX (K/H/R)) lorsqu'elle est activée par son activateur spécifique neuronal p35 (Beaudette et al., 1993 ; Lew et al., 1994 ; Tsai et al., 1994 ; Songyang et al., 1996 ; Amin et al., 2002). Cdk5 peut être activée par p35, p39 ou CCNI2 (Liu et al., 2017). L'activateur principal de Cdk5 demeure p35 (Takasugi et al., 2015), mais celui-ci est clivé en p10 et p25 par la *calpain*. Ce dernier segment entraîne toutefois la neurodégénération et est impliqué dans l'Alzheimer (Patrick et al., 1999 ; Lee et al., 2000 ; Tseng et al., 2002). La portion p10 possède un signal pour la dégradation via la voie ubiquitine-protéasome tandis que p25 est résistant à la protéolyse médiée par l'ubiquitine et a donc une demi-vie bien plus longue que p35. L'activateur p39 est aussi clivé en p10 et p29, contribuant à la dérégulation de Cdk5.

En plus d'être impliquée dans la tolérance aux opioïdes et dans la transmission de la douleur (Pareek et al., 2006a, 2006b), Cdk5 a aussi été montrée par plusieurs groupes comme interagissant avec le DOP. Le récepteur opioïde delta possède cette séquence consensus dans sa deuxième boucle intracellulaire (ICL2) au niveau des résidus 161 à 164 (TPAK) et cette séquence a été montrée comme étant phosphorylée par la Cdk5 dans des cellules neuronales (Xie et al., 2009). Son possible rôle dans l'expression du DOP à la surface a aussi été supporté par l'utilisation d'un inhibiteur des Cdks, la roscovitine, ainsi que par l'utilisation d'un mutant du site de phosphorylation de Cdk5 sur l'ICL2 (Xie et al., 2009). Dans les deux cas, une baisse de DOP exprimée à la surface de la cellule fut observée. Une autre étude effectuée par notre laboratoire a supporté ces résultats puisqu'en utilisant la roscovitine ou en bloquant l'ICL2 à l'aide d'un peptide mimétique, une baisse des effets anti-nociceptifs et anti-hyperalgésiques de l'agoniste sélectif du DOP, la deltorphine II, fut observée chez des rats traités à la morphine chronique ou avec de l'inflammation induite par le CFA (Beaudry et al., 2015). L'inhibition de Cdk5 ou de sa phosphorylation sur le DOP semble être associée à une baisse de récepteurs fonctionnels à la surface de la cellule et donc moins de récepteurs disponibles pour les agonistes d'où la diminution du potentiel analgésique de la deltorphine II lorsque Cdk5 est inhibée, supportant ainsi un rôle pour Cdk5 dans la régulation du trafic de DOP à la membrane plasmique. Cdk5 a aussi été montrée comme ayant un rôle dans

contrôle du trafic des récepteurs D2R, NMDA glutamate, et TRPV1 (Zhang et al., 2008 ; Jeong et al., 2013 ; Xing et al., 2012).

1.6 But de l'étude principale, objectifs et hypothèses

Le but principal de mes travaux de maîtrise était d'identifier des partenaires potentiels impliqués dans la régulation du trafic du récepteur opioïde delta et de caractériser ces interactions. Au cours des dernières années, j'ai pu travailler sur plusieurs projets ayant le même but, mais un des projets a émergé davantage, devenant ainsi le projet principal de ma maîtrise : l'interaction de Cdk5 sur le trafic du DOP. Les travaux sur cette interaction ayant déjà été abordé par d'anciens membres du laboratoire (Hélène Beaudry PhD et Etienne St-Louis MSc) sans toutefois y aller en profondeur au niveau *in vitro*, je me voyais ainsi travailler à la continuité de leurs travaux. D'un côté, Hélène Beaudry s'est intéressée aux effets *in vivo* d'un traitement avec un inhibiteur non-sélectif des Cdks, la roscovitine, sur les effets antinociceptifs et antihyperalgésiques de l'agoniste spécifique du DOP, la deltorphine II (Beaudry et al., 2015). Elle a observé une baisse de ces effets chez des animaux traités à la morphine chronique ainsi qu'au CFA, deux mécanismes connus ayant montré une augmentation de récepteurs DOP à la membrane plasmique. De plus, en utilisant un peptide qui compétitionnait avec la deuxième boucle intracellulaire du DOP, soit où se retrouve le site de phosphorylation de la Cdk5, elle a observé une baisse d'analgésie de la deltorphine II (Beaudry et al., 2015). Durant ses travaux de maîtrise, Etienne St-Louis s'est intéressé principalement au complexe COPI ainsi qu'aux différentes interactions au niveau cellulaire. Etienne a remarqué qu'un des sites de liaison de COPI sur le DOP chevauchait un site consensus de phosphorylation de la kinase cycline-dépendante, Cdk5. Il a donc effectué quelques expériences préliminaires et a observé une interaction entre Cdk5 et le DOP par immunoprécipitation. Les travaux de ces deux étudiants ont donc mené à mon projet principal de maîtrise portant sur l'interaction de Cdk5 avec le DOP et son impact sur son trafic. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à l'impact de la phosphorylation de Cdk5 lorsqu'elle est activée par p35, son activateur spécifique des neurones, ainsi qu'aux interactions entre ces différents partenaires et le DOP. En analysant de plus près le site de phosphorylation de Cdk5 sur l'ICL2 du DOP, on y remarque que la séquence consensus de

phosphorylation de Cdk5 chevauche un site de liaison de COPI au niveau de la Lys164 (figure 5). Cet élément a soulevé de nouvelles questions de recherche puisque d'un côté nous avons Cdk5 qui phosphoryle le DOP, permettant une augmentation de son expression de surface, et au même endroit nous avons un site de liaison du complexe COPI, principalement impliqué dans la rétention du DOP au niveau du Golgi/RE.

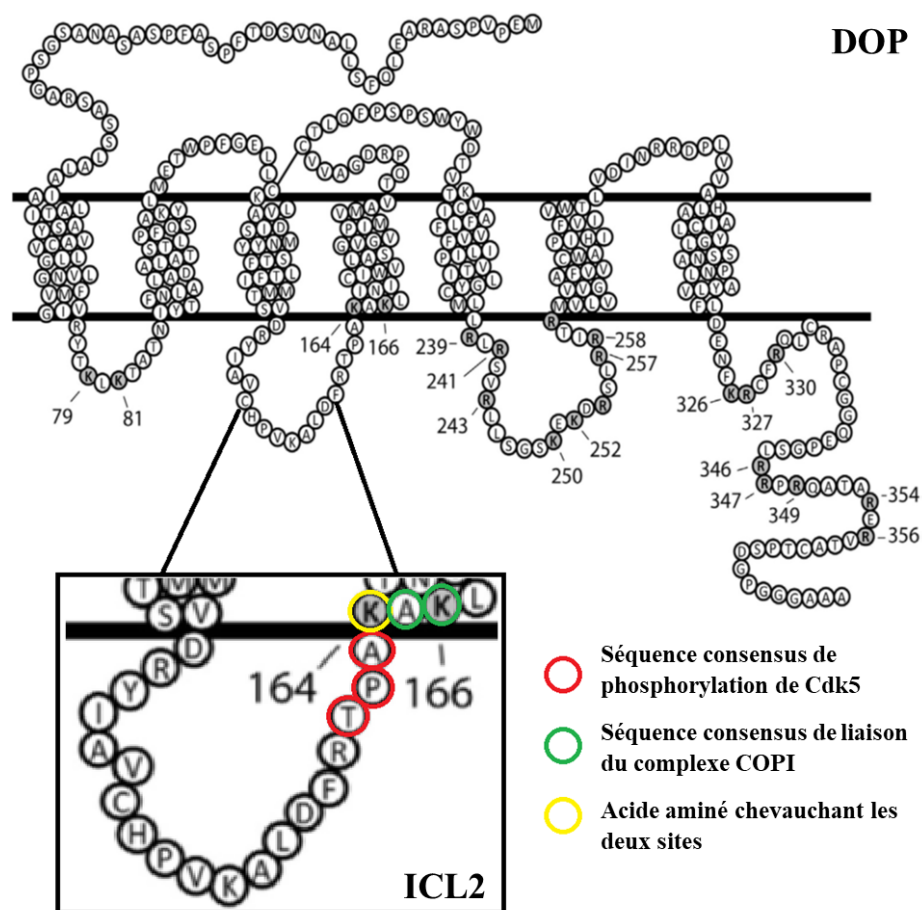


Figure 5 : Le site de phosphorylation de Cdk5 chevauche un des sites de liaison de COPI dans la deuxième boucle intracellulaire du récepteur DOP. Séquence en acides aminés du récepteur opioïde delta. Les acides aminés en gris représentent les 13 sites putatifs de liaison de COPI sur les domaines intracellulaires du DOP. (Figure originale tirée de St-Louis, 2017 avec permission et modifiée par Francis Bergeron).

Notre hypothèse est qu'en situation normale, le DOP est intracellulaire et non phosphorylé, donc COPI serait lié au DOP, expliquant sa rétention intracellulaire. Lorsque la deuxième boucle intracellulaire est phosphorylée par Cdk5, une fois activée par p35, la phosphorylation viendrait bloquer la liaison de COPI soit par encombrement stérique,

changement de conformation ou peut-être à cause des charges qui sont en jeu. Le DOP phosphorylé ne serait donc plus retenu au niveau du Golgi/RE et serait adressé à la membrane. Notre hypothèse est d'autant plus supportée par la littérature puisqu'une étude a montré la nécessité de la Thr161 et de la Lys164 afin que la phosphorylation ait bel et bien lieu (Xie et al., 2009). Dans ce cas-ci, l'importance de la Lys164, qui rappelons-le est comprise dans le site de liaison de COPI, pour la phosphorylation du DOP renforce l'idée que les deux ne peuvent arriver en même temps et donc, que la phosphorylation bloquerait bel et bien l'accès de COPI à ce niveau. Une autre hypothèse que nous avons émise est l'impact d'un traitement prolongé à la morphine ou de l'inflammation sur la phosphorylation du DOP par Cdk5. Nous croyons que dans de telles conditions, il y aurait une préférence pour la phosphorylation par Cdk5 vis-à-vis la rétention du DOP par COPI. Cette hypothèse est aussi supportée par la même étude qui a montré qu'un traitement prolongé à la morphine augmentait la phosphorylation de la Thr161 de l'ICL2 du DOP (Xie et al., 2009). La phosphorylation du DOP par Cdk5 a aussi été montrée comme ayant un rôle important au niveau de la tolérance à la morphine dans un modèle d'hypersensibilité inflammatoire induite par le CFA (Chen et al., 2012). Il est aussi important de souligner qu'il n'y a pas de séquence consensus de Cdk5 au niveau du récepteur opioïde mu (MOP) et que le site de liaison de Cdk5 demeure toujours inconnu à ce jour.

1.7 Projet principal : Rôle de Cdk5/p35 dans la régulation du trafic du récepteur opioïde delta

Nos objectifs pour ce projet étaient donc de caractériser comment Cdk5 et p35 agissaient sur l'adressage membranaire du DOP. Aussi, de déterminer quelles sont les conditions qui modulent la compétition entre Cdk5 et le complexe COPI. Ensuite, caractériser l'effet que des traitements et des stimulations peuvent avoir sur le DOP et ces interactions *in vitro* et *in vivo*. Pour ce faire, nous allons tout d'abord vérifier les niveaux d'association de base entre DOP et ces partenaires *in vitro* dans des cellules HEK293T, puis confirmer le domaine d'interaction où p35 et Cdk5 interagissent sur le récepteur. Ensuite, nous allons vérifier l'impact de l'activation de Cdk5 dans l'expression de surface du DOP. Finalement, nous allons vérifier l'implication de Cdk5 et COPI dans l'adressage du récepteur

opioïde delta en mesurant l'impact que leur présence ou absence peut avoir sur l'expression du DOP.

1.8 Projet secondaire : Interaction du récepteur opioïde delta avec les protéines de triage endosomal GASP-1, SNX1, NHERF-1 et NSF

Au cours de mes travaux portant sur la régulation du trafic du DOP, je me suis intéressé à plusieurs partenaires d'interaction. Parmi ceux-ci se retrouvaient 4 protéines impliquées dans le triage endosomal, soit GASP-1, SNX1, NHERF-1 et NSF. Notre hypothèse, avec les données que nous avions au départ, était que les protéines GASP-1 et SNX1, en situation normale, interagiraient avec le DOP pour l'envoyer aux lysosomes soit après internalisation ou lorsque les récepteurs sont intracellulaires et non sollicités (figure 6). D'un autre côté, nous croyons qu'un traitement à la morphine chronique et l'inflammation pourraient moduler les niveaux d'interactions et d'association des protéines de triage avec le DOP, en possiblement augmentant les interactions entre DOP et NSF/NHERF-1 ce qui favoriserait l'exportation des récepteurs vers la membrane plasmique (figure 6). Le but de cette étude était donc d'identifier si ces 4 protéines interagissaient bel et bien entre nos mains dans des modèles *in vitro* et *in vivo* sur le récepteur DOP sans ligand, en condition traitée ou non avec de la morphine ou en présence d'inflammation induite par le CFA. Pour ce faire, les niveaux d'association de base de ces 4 protéines ont été vérifiés *in vitro* dans des cellules HEK293. Puis, pour les protéines identifiées montrant une interaction avec le DOP, l'identification des domaines d'interaction précis ainsi que l'importance de leur présence dans le triage du récepteur DOP seront étudiés. Finalement, l'implication de ces protéines dans le trafic du DOP suite à un traitement prolongé à la morphine ou par inflammation sera étudiée.

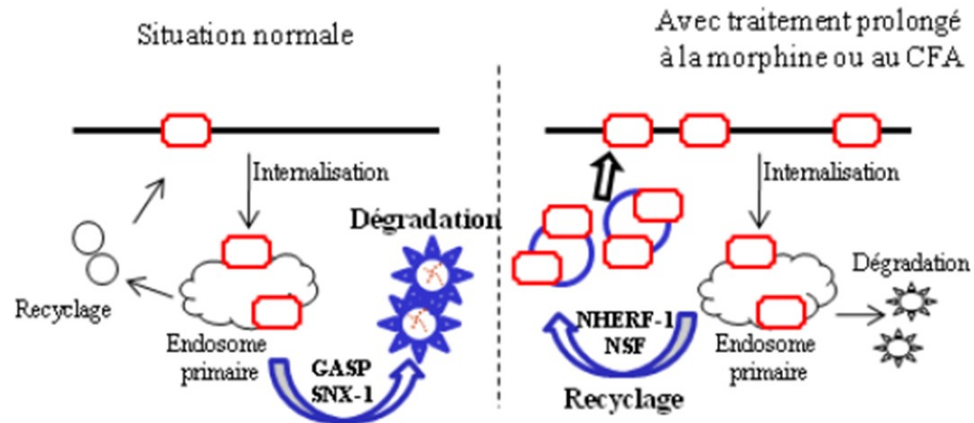


Figure 6 : Schématisation du rôle potentiel des protéines GASP et SNX1 dans la dégradation des récepteurs opioïdes delta, ainsi que NHERF-1 et NSF dans le recyclage des récepteurs opioïdes delta. En situation normale, le DOP (rectangle rouge) serait favorisé vers la dégradation par la machinerie GASP ou SNX1, tandis qu'en situation d'inflammation ou de traitement chronique à la morphine, ce serait plutôt le recyclage du DOP via les protéines NHERF-1 ou NSF (figure originale produite par Pr Louis Gendron et reproduite avec sa permission).

2. Matériels et Méthodes

2.1 Traitement et euthanasie des animaux

Des rats Sprague-Dawley, mâles (Charles River), sont commandés à un poids avoisinant 200-225 g. Les rats sont ensuite traités soit dans un modèle inflammatoire ou de morphine chronique. Dans le cas d'un modèle inflammatoire, les animaux sont injectés, à l'aide d'une seringue 26 G x ½, avec 100 µL d'une solution d'adjuvant complet de Freund (CFA) fraîchement resuspendue en émulsion 1 :1 avec une solution saline. L'injection est effectuée dans la patte arrière gauche de façon intraplantaire et les rats sont euthanasiés afin d'en récolter les tissus 72 heures plus tard. Dans le cas d'un modèle de morphine chronique, des injections sous-cutanées d'une solution de morphine-saline 0,9% à des doses croissantes de morphine-saline (5, 8, 10 et 15 mg/kg) toutes les 12 heures pendant 48 heures sont faites à l'aide d'une seringue 23 G ½. Après la durée des différents traitements, les rats sont anesthésiés à l'isoflurane puis euthanasiés par décapitation à la guillotine où les ganglions spinaux (ou DRG – *dorsal root ganglia*) L4 et L5 des rats sont récoltés. Des souris C57BL/6 sont aussi utilisées pour certaines expériences telle la co-immunoprécipitation *in vivo*. Des souris de type sauvage (Charles River), *knockout* ainsi que des souris *knock-in* (générées par Jim Boulter, *Department of Psychiatry & Biobehavioral Sciences, University of California in Los Angeles*) pour le gène du récepteur opioïde delta avec une étiquette Flag sont utilisées afin d'en récolter la moelle épinière, les DRGs ainsi que le cerveau. Tous les protocoles animaux ont été acceptés par le comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) de l'Université de Sherbrooke sous le protocole 242-18B.

2.2 Extraction d'ARNm (RT-qPCR ; extraction)

La purification et l'extraction de l'ARN total à partir des tissus ont été effectuées selon le protocole détaillé de Qiagen, RNeasy Mini Kit. Les DRGs au niveau lombaire L4 et L5 du côté ipsilatéral et controlatéral des rats ont été extraits et mis immédiatement dans une solution de RNA later (Sigma, #R0901) qui permet de stabiliser et protéger l'ARN des tissus non-congelés. Les tissus sont ensuite déchiquetés à l'aide de ciseaux chirurgicaux et tritturés à l'aide d'une seringue avec une aiguille de 20 G 1 ½. Ensuite, le protocole a

été respecté en y faisant quelques modifications, soit l'ajout d'une digestion à la DNase et en omettant le lavage des colonnes avec le tampon RW1. Les échantillons d'ARN sont analysés par réaction en chaîne par polymérase quantitative avec la transcriptase inverse (RT-qPCR) à l'aide du SYBR Green PCR Mix (Thermo Fisher) selon le protocole du fabricant.

2.3 Culture cellulaire

2.3.1 Mise en culture et passage des différents types de cellules

Les cellules HEK293 sont mises en culture dans un Petri de 10 cm avec 10 mL de milieu (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ; Wisent, Multicell) préchauffé à 37°C et complémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS) et 1% d'un mélange de pénicilline/streptavidine. Les lavages sont effectués avec 3 mL de PBS 1X (Wisent) préchauffé tandis que les cellules sont décollées à l'aide de 1 mL de trypsine (Wisent) et resuspendues dans 10 mL total avec du DMEM supplémenté. Dans le cas des cellules HEK293 stables, elles doivent être supplémentées avec de la gentamycine (G418, Wisent MultiCell, #cat 400-130-1G) à une concentration de 250 µg/mL. Les différents types cellulaires utilisés au cours de mes expériences sont tous dérivés de cellules HEK293. Parmi ceux-ci, on retrouve les HEK293T (ATCC) du laboratoire du Pr Parent, exprimant l'antigène SV40 large T, qui permet de lier les SV40 « enhancers » des vecteurs d'expression et donc d'augmenter la production de protéines, ainsi que les cellules AD293 du laboratoire du Pr Denault (Stratagene), qui sont des HEK293 modifiées pour être plus adhérentes. Dans la majorité des expériences d'interaction protéine-protéine, les cellules stables HEK293 exprimant de façon stable le récepteur DOP de souris avec une étiquette Flag en N-terminal (obtenues du Dr Richard Howells, New Jersey Medical School, Newark, KJ, USA) furent les plus utilisées. Par contre, l'expression du récepteur DOP diminue au fil des passages de celles-ci, donc on doit prévoir des cellules fraîchement dégelées tous les 15 passages environ. Des cellules neuronales NG108-15, hybride entre un neuroblastome de souris et un gliome de rat, ont aussi été utilisées afin de vérifier les différentes interactions dans un modèle neuronal. Le milieu de culture pour ces cellules était le même DMEM complémenté utilisé pour les HEK293, mais supplémenté avec 1% HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine).

2.3.2 Transfection

Pour la majorité des essais de co-immunoprécipitation (co-IP) ainsi que lors des expériences d'immunofluorescence (IF), l'agent de transfection X-tremeGENE HP (Roche/distribué par Sigma, #cat 6366546001) fut le plus utilisé. On utilise 1 Petri de 10 cm par condition et 10 µg d'ADN pour les co-IP tandis que pour les IF c'est plutôt 2 µg d'ADN dans des plaques 12-puits. L'agent transfectant est mélangé, dans un ratio agent : ADN de 1 : 1, avec de l'OPTI-MEM (Gibco), un milieu recommandé pour la plupart des agents de transfection et qui nécessite moins d'ajout de suppléments, dans un volume assez gros pour tous les échantillons (0,5 à 1,0 mL d'OPTI-MEM par condition pour les co-IP ; 0,1 à 0,2 mL pour les IF). Ensuite, ces volumes sont répartis dans les nouveaux tubes contenant l'ADN et laissés incuber 20 minutes sous la hotte. Finalement, le contenu de chaque tube est ajouté à son Petri correspondant, préalablement ensemencé la veille avec le nombre de cellules souhaité (1 million pour les co-IP et 100 000 cellules pour les IF). Le Petri est agité de façon à ce que la solution soit répandue de façon homogène et le tout est incubé dans un incubateur à 37°C pour 48h. Dans le cas de l'agent TransIT-LT1, utilisé pour certaines co-IP, ELISA et pour les essais avec les DsiRNA, la méthode est identique au X-tremeGENE HP, mais avec un ratio agent : ADN de 2 : 1.

2.4 Immunobuvardage et co-immunoprécipitation

2.4.1 Récolte des cellules, extraction des protéines et immunoprécipitation

Les cellules HEK293 stables ou transitoires sont ensemencées dans des Petri de 10 cm à un compte de 1 million de cellules. Au jour 2, un total de 10 µg d'ADN des différentes constructions est transfecté en utilisant soit X-tremeGENE HP (Roche) ou TransIT-LT1 (Mirus Bio, #cat MIR 2304) tel que décrit en 2.3.2. Les cellules sont incubées 48h puis, au jour 4, sont récoltées pour en extraire les protéines. Tout d'abord, le milieu est aspiré et les cellules sont lavées avec du PBS 1X froid. Ensuite, elles sont grattées dans du PBS 1X EDTA 2 mM/EGTA 2 mM. Les cellules sont par la suite centrifugées à 3500 rpm pendant 1 minute à 4°C. Le surnageant est aspiré et le culot est resuspendu dans 300 µL de tampon de lyse RIPA modifié (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 1% NP-40, 0,5% sodium déoxycholate, 0,1% SDS, 10 mM Na₄PP et 5 mM EDTA) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Sigma C852A34). Le tout

est bien mélangé et incubé pendant 1 heure avec rotation à 4°C. Puis, les lysats sont centrifugés à 13 000 rpm pendant 20 minutes et le culot est retiré pour être jeté. Les échantillons sont ensuite dosés par la méthode de Bradford et un volume de 30 µL (10% du total) servant de contrôle de lysat cellulaire est récolté auquel est ajouté 10 µL de tampon laemmli. Les échantillons sont ensuite incubés avec 1 µL d'anticorps FlagM2 (1 :300 ; Sigma Aldrich) jusqu'au lendemain avec rotation à 4°C. Au jour 4, les échantillons sont immunoprécipités en ajoutant 30 µL du mélange de billes A/G-Sépharose (GE Healthcare) pendant 60 minutes avec rotation à 4°C. Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 4°C à 3000 rpm pendant 1 minute. Le surnageant est ensuite aspiré et les billes sont lavées 3 fois avec le tampon de lyse. Finalement, lors du dernier lavage, le surnageant est aspiré et 40 µL de laemmli est ajouté aux billes qui seront ensuite analysées par gel SDS-PAGE.

2.4.2 Immunobuvardage

Des gels 10% acrylamide ou 12% acrylamide pour les protéines < 60 kDa telles Cdk5 et p35 sont préparés et les protéines sont séparées à 150 V pendant 80 minutes avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose à 400 mA (constant) pendant 1 heure. Les membranes sont ensuite bloquées avec du TBS-Tween 0,1% + Lait 5% pendant environ 30 minutes. Pendant le blocage, les anticorps primaires sont préparés dans du TBS-Tween 0,1% Lait 5% (voir tableau 4 en annexe). Les membranes sont ensuite incubées dans 3 mL de la solution d'anticorps primaire dans des pochettes jusqu'au lendemain avec agitation à 4°C. Normalement, la majorité des anticorps utilisés au laboratoire sont validés à une dilution 1 :1000 dans du lait 5% (anti-Cdk5 DC-17), mais certains ont une meilleure affinité et demandent des dilutions plus élevées : anti-HA Hrp (1 :3000), anti-myc Hrp (1 :6000) (voir tableau 4 en annexe pour la liste des anticorps). Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois 10 minutes avec du TBS-Tween 0,1% puis incubées dans une solution de TBS-Tween 0,1% avec 3% BSA ou 5% lait avec l'anticorps secondaire (souris ou lapin) couplé à la peroxydase de raifort (Hrp) 1 :5000 pendant 1 heure avec agitation à température pièce. Les membranes sont finalement lavées encore 3 fois 10 minutes avec du TBS-Tween 0,1% et révélées par électrochimiluminescence (ECL) (GE Healthcare, RPN2232). Lorsque les membranes doivent être révélées avec un autre anticorps, par exemple anti-actine, elles sont décapées avec du NaOH 0,4 N deux fois 10 minutes avec agitation. Les membranes sont

rincées brièvement avec de l'eau puis lavées 5 minutes au TBS-Tween 0,1%. Elles sont à nouveau bloquées pendant environ 10 minutes et les étapes à partir de l'incubation de l'anticorps primaire jusqu'à la révélation sont répétées.

2.5 Essais de GST Pull-down

2.5.1 Production protéique, extraction et purification des protéines recombinantes

Tout d'abord, au jour 1, 5 mL de milieu LB ampicilline estensemencé avec des bactéries C41 transformées avec la construction désirée et laissé incubé le tout à 37°C jusqu'au lendemain. Au jour 2, 100 mL de LB ampicilline est inoculé avec 2 mL de la culture du jour 1 et laissé croître à 37°C tout en s'assurant que la densité optique à 595 nm demeure entre 0,4 et 0,6. Ensuite, la croissance est arrêtée en mettant les cultures sur glace pendant au moins 20 minutes ou jusqu'en fin de journée. Puis les cultures sont induites avec 0,4 mM d'IPTG + 2% éthanol 100% et laissées incubé jusqu'au lendemain à température pièce avec agitation. Au jour 3, les cultures sont centrifugées pendant 20 minutes à 4000 rpm à 4°C, puis le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 2 mL de tampon A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0, 10% glycérol, 0,5% NP-40, 2 mM DTT et inhibiteurs de protéases) par 100 mL de culture. Le culot est ensuite transféré dans des tubes de 2 mL où on y ajoute 1 mg/mL de lysozyme pendant 30 minutes à 4°C avec agitation. Puis, une pointe de spatule de DNase I est ajoutée aux cultures avant de laisser incubé encore 30 minutes. Pendant cette incubation, 0,2 mL de billes glutathion-sépharose par 100 mL d'échantillon sont lavées et bloquées 5 fois avec 1 mL de PBS 1X + BSA (10 mg/mL) en centrifugeant 1 minute à 2000 rpm. Avec le dernier lavage, les billes sont laissées incubé 30 minutes à température pièce. Après l'incubation avec la DNase I, les échantillons sont soniqués 1 x 15 secondes à intensité #3, puis centrifugés 25 minutes à 13 000 rpm à 4°C. Les surnageants sont ensuite combinés avec les billes glutathion-sépharose préalablement lavées et le tout est incubé 1 heure à 4°C avec rotation. Le mélange est ensuite lavé 5 fois avec 1 mL de tampon A et les billes sont finalement resuspendues dans 100 µL de tampon A + 20% de glycérol. 10 µL de ce mélange est conservé pour le contrôle de la fraction liée et le reste est congelé à -80°C. 10 µL de laemmli avec β-mercaptoéthanol est ajouté au 10 µL de contrôle de la fraction liée et mis à bouillir pendant 5 minutes à 100°C. Un volume de 10 µL est analysé sur un gel SDS-PAGE 10% (150 V pendant 1 heure). Le gel est ensuite coloré au

bleu de Coomassie (0,4% bleu de Coomassie, 50% éthanol, 10% acide acétique) pendant 30 minutes à température pièce avec agitation. Le gel est ensuite rincé deux ou trois fois (afin d'enlever le plus possible de bleu de Coomassie) avec la solution de décoloration (15% éthanol, 5% acide acétique), puis le gel est décoloré jusqu'au lendemain à température pièce avec agitation. Le gel est ensuite séché et conservé comme contrôle d'expression des différentes boucles intracellulaires.

Pour la purification protéique avec l'étiquette poly-Histidine, les constructions Cdk5 et p35 ont été clonées avec 6 Histidine en C-terminal dans le vecteur d'expression bactérien pET-3a. Une fois les constructions obtenues, au jour 1, 4 mL de milieu LB avec ampicilline est inoculé avec les bactéries de la protéine de fusion souhaitée. Au jour 2, 50 mL de LB avec ampicilline est inoculé avec 1 mL de la culture du jour 1 (ratio 1 :50). La culture est laissée à 37°C pendant 2 à 2h30 ou jusqu'à ce que la densité optique atteigne entre 0,6 et 1,0. Puis, la culture est mise sur glace et induite avec 0,4 mM d'IPTG (*Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside*) supplémenté avec 2% d'éthanol jusqu'au lendemain avec agitation à température pièce. Au jour 3, la culture induite est centrifugée pendant 20 minutes à 3000 rpm à 4°C, puis le surnageant est décanté. Le culot est incubé sur glace pendant 15 minutes, puis resuspendu dans 1 mL de tampon de lyse (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM imidazole et 1/500 de mélange d'inhibiteurs de protéases CLAP, pH ajusté à 8,0) supplémenté avec 1% de sarkosyl (par 50 mL de culture initiale). Le tout est incubé pendant 60 minutes à 4°C avec rotation en présence de 1 mg/mL de lysosyme. Pendant ce temps, 0,25 mL de résine 50% Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic acid) (par 100 mL de culture) est lavé avec 2 fois 5 mL et 1 fois 10 mL de PBS 1X BSA 10 mg/mL. Puis, la résine est resuspendue dans du PBS 1X BSA 10 mg/mL et incubée pendant 30 minutes avec rotation à température pièce (dans des tubes de 2 mL). Après le 60 minutes d'incubation, les mélanges de culture sont soniqués 4 fois 20 secondes à une intensité de 45 tout en laissant les tubes sur glace entre chaque sonication. Puis, les mélanges sont centrifugés pendant 20 minutes à 13 000 rpm à 4°C et le surnageant est conservé avant d'être combiné avec la résine pour chaque échantillon et incubé 1 heure à 4°C avec rotation. Les mélanges sont ensuite lavés 2 fois avec 4 mL de tampon de lavage (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 20 mM imidazole et 1/500 de mélange d'inhibiteurs de protéases CLAP, pH ajusté à 8,0) dans une colonne à immunoprécipitation.

Finalement, les protéines sont éluées 4 fois avec 0,25 mL de tampon d'éluion (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM imidazole et 1/500 de mélange d'inhibiteurs de protéases CLAP, pH ajusté à 8,0) en laissant incubé 5 minutes la résine avec le tampon avant chaque éluion, puis le tout est conservé à -80°C.

2.5.2 Pull-down sur lysat cellulaire et protéines purifiées Histidine

Pour l'essai de « pull-down » aux jours 4 et 5, un volume déterminé par l'expression de chaque domaine de protéines fusionnées à la GST (par exemple, ce volume variait entre 1 et 2 µL pour les trois premières boucles intracellulaires et était de 10 µL pour la queue C-terminal) est combiné à un volume de billes glutathion-sépharose, pour un total de 30 µL par condition. Normalement, ces volumes sont déterminés à l'aide d'une courbe standard BSA sur le gel de Coomassie, mais celle-ci a été omis lors de ces purifications (voir section 4.2.2 et 4.5 pour plus de détails). Des contrôles de billes (30 µL de billes) et de la protéine de fusion GST seule sont utilisés. Puis, le tout est lavé deux fois (2 minutes, 4000 rpm) avec 1 mL de tampon A supplémenté avec des inhibiteurs de protéases et 2 mM DTT. Ensuite, si le pull-down est effectué sur lysat cellulaire, la quantité lysée (300 µL) à laquelle on a préalablement pris un contrôle de lysat est ajoutée au 30 µL de billes + protéine fusionnée GST (lysé dans 300 µL de tampon RIPA modifié auquel 30 µL a été conservé comme contrôle). Si la protéine fusionnée à l'histidine est utilisée, 10 µL de Cdk5-Histidine ou p35-Histidine est ajoutée au mélange de protéine fusionnée à la GST + billes pour ensuite être mélangé brièvement par inversion. Ces mélanges sont ensuite centrifugés et 30 µL de chaque surnageant auquel on ajoute 10 µL de laemmli est conservé, ce qui servira de contrôle. Que ce soit sur lysat cellulaire ou avec des protéines purifiées histidine, le tout est ensuite incubé à 4°C avec rotation pour un temps dépendant de chaque échantillon, domaine et protéine utilisés. Dans le cas de Cdk5 et p35 purifiées à Histidine avec les boucles intracellulaires du récepteur DOP, environ 1 heure d'incubation suffit. Les billes sont ensuite lavées 4 fois avec 1 mL de tampon A supplémenté. Après le dernier lavage, les billes sont resuspendues dans 50 µL de laemmli et sont bouillies pendant 5 minutes à 100°C, tout comme les contrôles conservés avant le pull-down. Les échantillons sont finalement analysés par gel SDS-PAGE, où on utilise des anticorps contre Cdk5 et GST (SDS-PAGE tel que décrit en 2.4.2).

2.5.3 Utilisation de peptides mimétiques de l'ICL3

Des composés peptidiques répliquant des sections de la troisième boucle intracellulaire du DOP (voir tableau 1) ont été synthétisés par la plateforme peptidique de l'Institut de Pharmacologie de Sherbrooke. Avec ces trois peptides mimétiques, la totalité de la boucle intracellulaire est couverte, ce qui permet d'identifier des sites d'interaction plus facilement. Les peptides sont utilisés à 10 mM, à une quantité 10x plus élevée que la boucle complète, afin qu'il y ait compétition pour le site. La méthode utilisée est la même que dans le cas d'un pull-down avec des protéines purifiées Histidine. Tout d'abord, 10 µL de Cdk5-Histidine est incubé avec la quantité déterminée de peptides mimétiques, correspondant à 10 x plus que la boucle complète, dans 500 µL de tampon A (avec inhibiteurs de protéases et DTT) par condition. Pendant l'incubation de 30 minutes à 4°C avec rotation de la protéine purifiée avec les peptides, les billes glutathion-sépharose avec les protéines fusionnées à GST sont lavées deux fois avec le tampon A complet. Après l'incubation, le volume de tampon A contenant Cdk5-His et les peptides est ajouté aux billes pour chaque condition. Le mélange est incubé pour environ 40 minutes à 4°C avec rotation. Les mélanges sont ensuite lavés 4 fois et les billes sont finalement resuspendues dans 50 µL de Laemmli, puis analysées par gel SDS-PAGE tel que décrit précédemment.

Nom	Structure
3 ^{ème} boucle intracellulaire du DOP	LMLLRLRSVRLLSGSKEKDRSLRRITRM
Peptide #1 (MAB7041)	Ac-LMLLRLRSVR-amide
Peptide #2 (MAB7042)	Ac-SKEKDRSLRRITRM-amide
Peptide #3 (MAB7043)	Ac-VRLLSGSKEKDR-amide

Tableau 1 : Séquence des peptides mimétiques de la troisième boucle intracellulaire du récepteur opioïde delta de rat.

2.6 Expression de surface par ELISA

Les cellules HEK293 stables ou transitoires sontensemencées dans des plaques 24-puits pré-traitées 15 minutes à la poly-L-Lysine (puis lavées à l'eau et séchées) à un compte de 50 000 cellules/mL. Chaque échantillon est effectué en triplicata puis, 24h plus tard, la transfection est effectuée à l'aide de l'agent TransIT-LT1 avec un ratio agent : ADN de 2 : 1

dans un volume d'OPTI-MEM de 100 μ L par échantillon et les cellules sont incubées pour 48 heures dans un incubateur à 37°C. Au jour 4, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont fixées avec 0,5 mL de TBS 1X + 3,7% formaldéhyde pendant 5 minutes à la noirceur puis lavées 2 fois avec du TBS 1X avec agitation. Par la suite, les cellules sont bloquées avec du TBS 1X + 1% BSA (albumine de sérum bovin) pendant 30 minutes à température pièce avec agitation. Puis, la solution est aspirée et l'anticorps primaire est préparé dans du TBS 1X + 1% BSA (0,3 mL par puits) et ajouté dans la plaque pendant 1 heure à température pièce avec agitation. Les puits sont lavés 2 fois au TBS 1X, puis bloqués un 10 minutes additionnel avant d'y ajouter l'anticorps secondaire couplé à l'alcaline phosphatase dans du TBS 1X + 1% BSA pendant 1 heure à température pièce avec agitation. La solution est aspirée et les puits sont à nouveau lavés 2 fois au TBS 1X, puis la solution de développement est préparée (48,5 mL diéthanamine ; 12,5 μ L $MgCl_2$ 0,5 M ; pH 9,8 ; 500 mL total). Chaque puits compte pour 0,25 mL et un comprimé de substrat phosphatase (Sigma, #cat S0942) par 5 mL de diéthanamine y est ajouté. La solution de développement est agitée pendant la dernière série de lavages. La plaque est aspirée et 0,25 mL de la solution de développement par puits est ajoutée. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C jusqu'à ce que le liquide devienne jaune et une absorbance à 405 nm se situant entre 0,4 et 1,0. Selon la concentration de l'anticorps, par exemple avec l'anticorps polyclonal Flag (Thermo Fisher) pour la détection de Flag-DOP, une incubation de 5 à 10 minutes était nécessaire. Pour arrêter la réaction, 0,25 mL de NaOH 0,4 N est ajouté par puits et 200 μ L de chaque puits est transféré dans une plaque 96-puits pour y lire l'absorbance à 405 nm.

2.7 DsiRNA : petits ARN interférents

Tout d'abord, au jour 1, les cellules sontensemencées à un compte de 300 000 cellules par puits dans une plaque de 6-puits. Pour les DsiRNAs (IDT ; Integrated DNA Technologies, Inc.) contre Cdk5 (hs-Ri-CDk5.13.2 : 5'-CGAUGACCAGUUGAAGAGGAUCUTC-3' et 3'-CAGCUACUGGUCAACUUCUCCUAGAAG-5') et contre COPB1 (HSC.RNAI.N001144061.12.1 : 5'-GGAUCACACUAUCAAGAAAUUACTT-3' et 3'-GUCCUAGUGUGAUAGUUCUUUAAUAA-5'), ils répondent mieux après 72h, donc ils sont transfectés dans les cellules au même moment que l'ensemencement. Pour se faire, la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) est utilisée selon les instructions du fabricant et mélangée

avec de l'OPTI-MEM (dans un volume assez élevé pour toutes les conditions ; 2 μ L de Lipofectamine et 100 μ L de milieu par condition). Par la suite, 11 μ L de DsiRNA (50 nM final) est mélangé avec 100 μ L d'OPTI-MEM par condition et incubé 8 minutes. 100 μ L du mélange contenant la Lipofectamine est ajouté aux tubes contenant les DsiRNA et incubé pendant 20 minutes sous la hotte. La totalité du contenu de chaque tube est disposé dans son Petri correspondant pendant 72h dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂. Au jour 2, les constructions d'ADN (p35-myc, COPB1-myc et pcDNA3) sont transfectées avec l'agent TransIT-LT1 tel que décrit à la section 2.3.2 en utilisant 3 μ g d'ADN. Au jour 4, le milieu des Petri est aspiré et les cellules sont récoltées dans 150 μ L de tampon Laemmli 1X contenant du Beta-mercaptoéthanol. Les cellules sont ensuite soniquées deux fois 10 secondes, puis chauffées pendant 1 heure à 37°C. Les échantillons sont finalement analysés sur gel SDS-PAGE tel que décrit à la section 2.4 en utilisant un anticorps primaire contre la protéine ciblée par le DsiRNA afin de valider le bon fonctionnement de ces outils. Après la révélation au ECL, les membranes sont décapées au NaOH 0,4 N puis révélées à nouveau en utilisant un anticorps contre l'actine pour vérifier que la baisse observée est bel et bien causée par le DsiRNA et non par une baisse des niveaux protéiques. Dans le cas des expériences d'expression de surface par ELISA, les volumes utilisées de DsiRNA étaient ajustés pour une plaque 24-puits en triplicata, soit 8,25 μ L de DsiRNA dans 75 μ L d'OPTI-MEM (pour 3 puits) et 1,5 μ L de Lipofectamine 2000 dans 75 μ L d'OPTI-MEM par condition. Le tout était mis ensemble après 8 minutes d'incubation et, 20 minutes plus tard, 50 μ L du mélange était ajouté par puits. L'effet de ces outils est comparé à un contrôle négatif, DsiCTRL (DS NC1, Integrated DNA Technologies, Inc.), qui représente une séquence qui n'est pas reconnu dans les transcriptomes autant chez l'humain, la souris et le rat, donc qui n'a pas d'activité.

3. Résultats

3.1 : Interactions entre p35, Cdk5 et FlagDOP

Puisqu'un site consensus de phosphorylation de Cdk5 est retrouvé au niveau de la deuxième boucle intracellulaire du récepteur opioïde delta, tel qu'indiqué dans la figure 5, il était important de déterminer si Cdk5 interagissait avec le DOP. Du même coup, puisque Cdk5 est activée par la *cyclin-like* p35, il était important de vérifier si p35 interagissait aussi avec le récepteur en plus d'activer la kinase. Des cellules HEK293T ont donc été transfectées avec les différentes constructions p35-myc, Cdk5-HA ainsi que FlagDOP. Une immunoprécipitation du récepteur a été ensuite effectuée sur les protéines extraites des cellules à l'aide d'un anticorps Flag, ciblant l'étiquette moléculaire du DOP. Le tout étant analysé par SDS-PAGE, des anticorps ciblant les étiquettes de soit Cdk5-HA (HA-Hrp) ou bien p35-myc (myc-Hrp) ont été utilisés afin de déterminer si ces protéines étaient précipitées avec le récepteur opioïde delta et donc si elles interagissaient avec celui-ci. Le premier panneau de la figure 7 indique une interaction entre Cdk5-HA et FlagDOP lorsque ceux-ci sont coexprimés tandis que dans le deuxième panneau de la figure 7, une interaction entre p35-myc et FlagDOP est observée lorsque coexprimés. Un point intéressant à noter est que, lorsque FlagDOP est transfecté en compagnie de Cdk5-HA et p35-myc, les interactions observées entre soit Cdk5-HA/FlagDOP ou p35-myc/FlagDOP sont perdues.

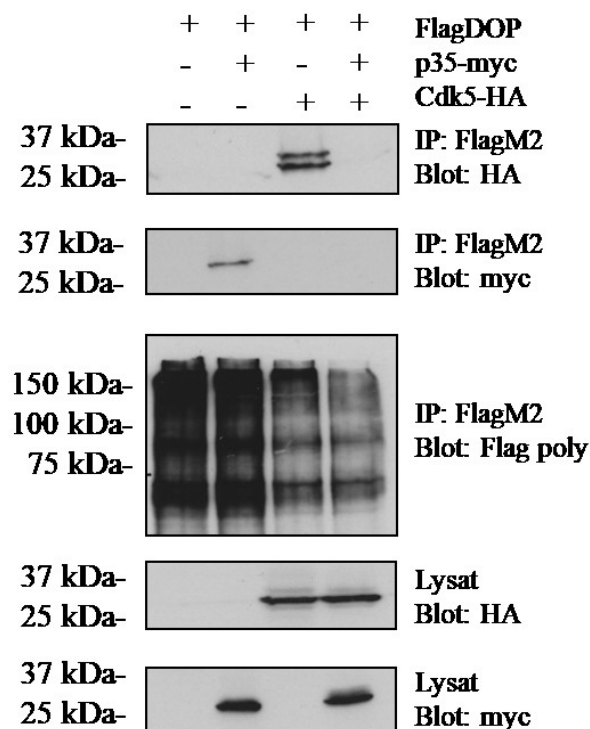


Figure 7 : Interactions de Cdk5-HA et p35-myc avec le FlagDOP par co-immunoprécipitation. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les constructions FlagDOP et/ou p35-myc et/ou Cdk5-HA. Les cellules ont été lysées 48h post-transfection et l'immunoprécipitation a été effectuée avec l'anticorps FlagM2. Les protéines Cdk5-HA et p35-myc sont détectées à l'aide des anticorps couplés à HRP contre leurs étiquettes moléculaires, HA-HRP et myc-HRP respectivement. Résultats représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

Puisque ces protéines sont transfectées et que seule Cdk5 est présente de façon endogène dans les cellules rénales HEK293, un modèle de cellules neuronales, soit les NG108-15 (provenant du laboratoire du Pre Nicole Gallo-Payet), a été utilisé afin de valider si le résultat obtenu était reproductible dans une autre lignée. Les constructions d'ADN de FlagDOP, Cdk5-HA et p35-myc ont été transfectées dans les cellules NG108-15 avec l'agent de transfection X-tremeGENE HP et une immunoprécipitation du récepteur FlagDOP avec un anticorps Flag a été effectuée (figure 8). Bien que l'expression endogène de p35 ne soit pas confirmée dans la littérature dans ces cellules, on a tout de même pu obtenir un résultat semblable, bien que préliminaire. L'avantage de ces cellules est qu'elles sont une lignée neuronale, donc si des effecteurs présents qu'à ce niveau étaient nécessaires pour influencer le trafic du DOP chez l'humain, il est plus plausible que ceux-ci soient présents dans les cellules NG108-15. Ces résultats suggèrent que Cdk5 interagit bel et bien avec le récepteur opioïde delta lorsque coexprimés, tout comme son activateur p35, dans des conditions de

surexpression. De plus, l'interaction entre Cdk5 et FlagDOP est perdue lorsque p35, Cdk5 et FlagDOP sont coexprimés, tout comme dans les cellules HEK293. Puisqu'il ne semble pas avoir de différence notable entre les deux lignées cellulaires et que p35 ne semble pas présente de façon endogène dans aucune des deux, les cellules HEK293 ont été utilisées pour la suite. Ces cellules sont facilement transfectables, adhèrent bien et sont simples à entretenir. Elles ont des désavantages par contre tels qu'elles ne représentent aucun modèle physiologique et n'expriment pas beaucoup de protéines endogènes, rendant les interactions protéines-protéines plus difficiles à travailler sans transfection. Par contre, puisque les constructions utilisées sont transfectées dans ces cellules, cela reste un modèle acceptable pour nos études. On s'est donc posé la question à savoir si Cdk5 interagissait toujours avec son activateur p35 malgré qu'ils n'interagissent plus avec FlagDOP lorsque les deux sont coexprimés. La question à se poser était maintenant de savoir si ces deux partenaires forment un complexe lorsque p35 active Cdk5 ou si c'est un mécanisme trop dynamique empêchant la détection de cette interaction.

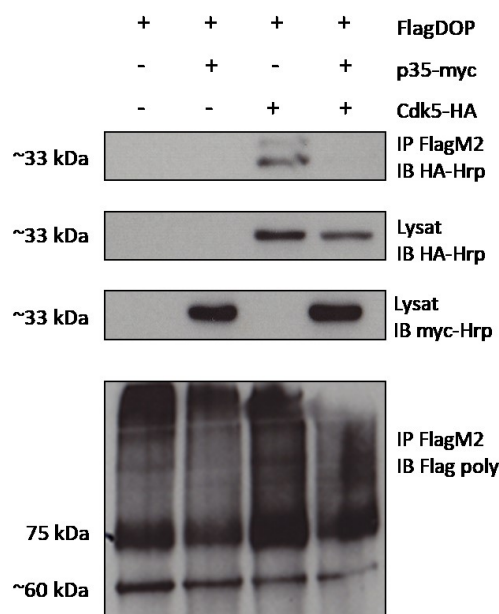


Figure 8 : Interactions entre Cdk5 et p35 avec FlagDOP par co-immunoprécipitation dans un modèle de cellules neuronales NG108-15. Des cellules NG108-15 ont été transfectées avec les constructions FlagDOP et/ou p35-myc et/ou Cdk5-HA. Les cellules ont été lysées 48h post-transfection et l'immunoprécipitation du FlagDOP a été effectuée avec l'anticorps FlagM2. Les protéines Cdk5-HA et p35-myc sont détectées à l'aide des anticorps couplés à HRP contre leurs étiquettes moléculaires, HA-HRP et myc-HRP respectivement. Résultat préliminaire n=1.

Tout d'abord, une immunoprécipitation de soit Cdk5-HA ou p35-myc a été effectuée dans des cellules HEK293T transfectées avec l'agent de transfection X-tremeGENE HP (Figure 9A). Lorsque Cdk5-HA était immunoprécipitée par un anticorps ciblant son étiquette HA, p35-myc était révélée avec un anticorps myc et l'inverse dans le cas où p35 est immunoprécipitée. La figure 9A indique que p35 et Cdk5 interagissent ensemble lorsqu'elles sont coexprimées. La suite était donc de vérifier si le complexe Cdk5-p35 se formait aussi en présence du récepteur opioïde delta. La même expérience a donc été répétée dans des cellules HEK293 où le récepteur FlagDOP est exprimé de façon stable (Figure 9B). Des résultats semblables ont été obtenus, comme le démontre les 2 panneaux supérieurs de la figure 11B, l'interaction entre p35 et Cdk5 est toujours observée malgré la présence du FlagDOP. Ces résultats suggèrent que DOP interagit avec Cdk5 et p35 sauf lorsque ces deux protéines sont coexprimées. Cependant, l'interaction entre Cdk5 et p35 n'est pas affectée par l'expression de DOP.

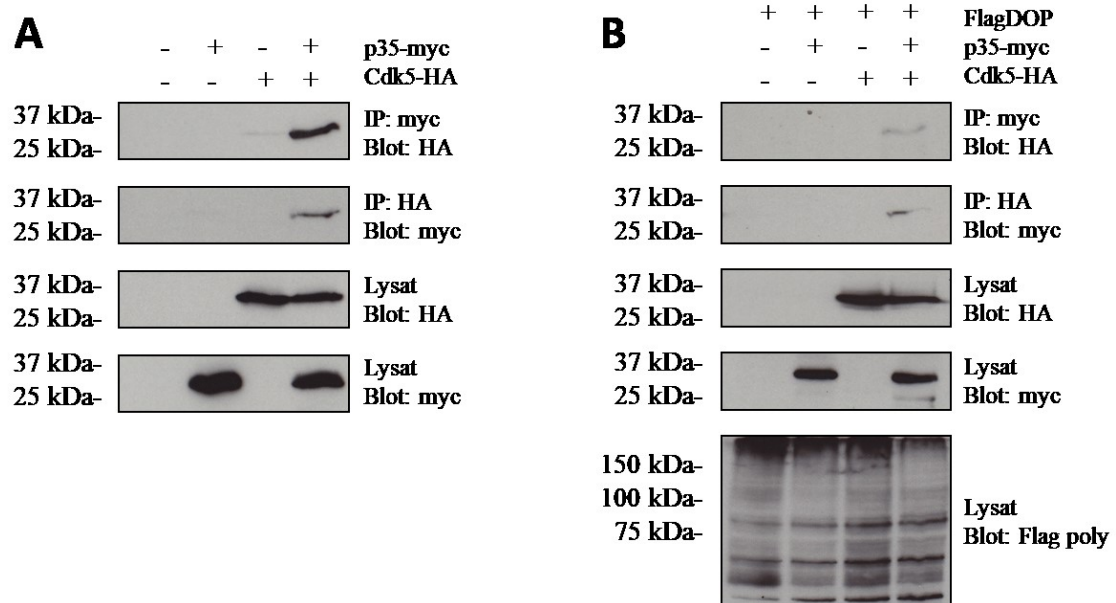


Figure 9 : Cdk5-HA co-immunoprécipite avec p35-myc en absence (A) ou en présence (B) du récepteur opioïde delta.
A) Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les constructions Cdk5-HA et/ou p35-myc pendant 48h. L'immunoprécipitation de Cdk5-HA ou de p35-myc a été effectuée à l'aide d'anticorps contre les étiquettes moléculaires HA et myc respectivement. Les protéines Cdk5-HA et p35-myc ont été détectées avec des anticorps couplés à la HRP, HA-HRP et myc-HRP. **B)** Des cellules HEK293 exprimant le récepteur FlagDOP de façon stable ont été transfectées avec les constructions Cdk5-HA et p35-myc pendant 48h. L'immunoprécipitation et la détection par immunobuvardage ont été faits comme en A. Résultats représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

3.2 : Identification du domaine d'interaction de DOP avec Cdk5 et p35

Maintenant que l'interaction de Cdk5 et p35 avec le DOP est confirmée, tout comme l'interaction de Cdk5 avec son activateur p35, nous nous sommes intéressés à identifier le domaine d'interaction de DOP avec ces deux partenaires. Pour ce faire, des essais de « pull-down » ont été effectués en utilisant les trois différents domaines intracellulaires ainsi que la queue C-terminale du DOP fusionnées à la protéine de fusion GST. Les constructions Cdk5-HA et p35-myc ont été transfectées seules et ensemble dans des cellules HEK293T puis les lysats ont été ajoutés au mélange de billes contenant les différents domaines du DOP fusionnés à GST. La figure 10 démontre des liaisons non-spécifiques des différents domaines de DOP avec Cdk5 et p35, puisqu'on détecte du signal avec la protéine de fusion GST seule qui sert de contrôle. De plus, il n'y a pas de différence notable entre les conditions, soit Cdk5-HA seule, p35-myc seule ou bien les deux coexprimées. Il semble par contre y avoir une plus forte interaction entre p35-myc et la troisième boucle intracellulaire du DOP, mais ces résultats n'ont pu être reproduits lors des différentes expériences indépendantes. Ces résultats suggèrent des interférences contenues dans les lysats cellulaires des cellules HEK293 qui viendraient altérer les interactions de p35 et Cdk5 avec les domaines intracellulaires du DOP.

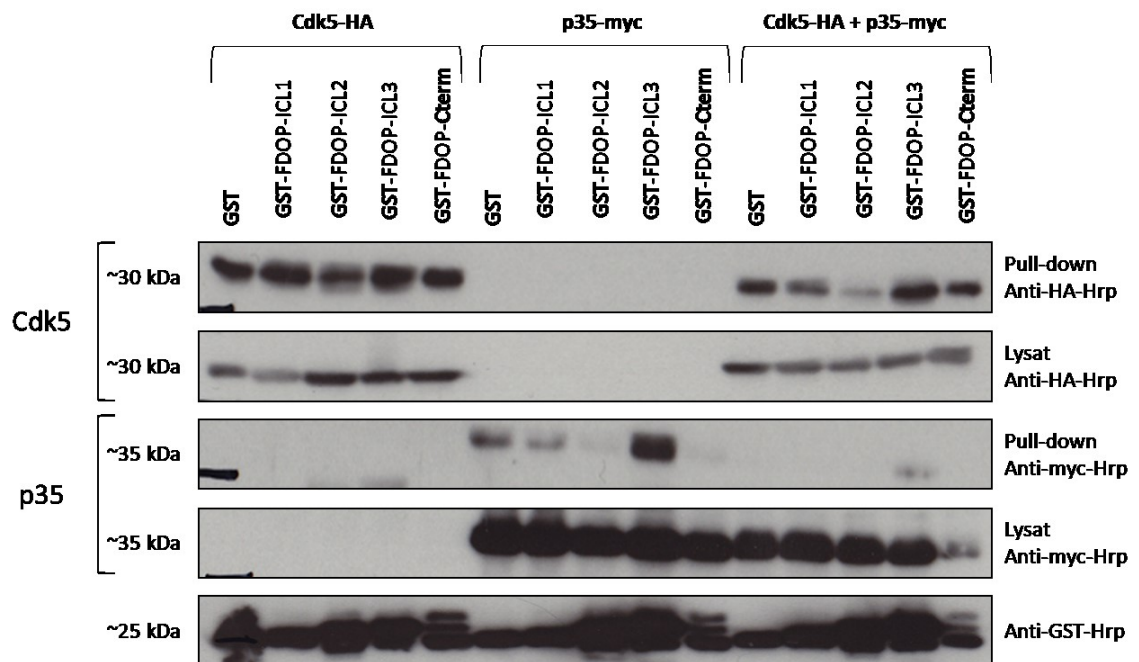


Figure 10 : Liaisons non-spécifiques de Cdk5 et p35 avec les différents domaines intracellulaires du DOP. Des essais de GST pull-down des trois boucles intracellulaires et de la queue C-terminale du DOP ont été effectués sur des lysats cellulaires de cellules HEK293T transfectées avec les constructions Cdk5-HA, p35-myc et les deux cotransfectées. Les

liaisons ont été observées par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques contre les étiquettes moléculaires de Cdk5 et p35, HA-Hrp et myc-Hrp, et les protéines fusionnées à GST ont été révélées avec un anticorps contre GST couplé à Hrp. Les résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

Puisque la détection de façon spécifique l'interaction entre DOP et p35 ou Cdk5 était difficile à obtenir, l'approche utilisée a été changée et un « pull-down » en utilisant les mêmes domaines intracellulaires fusionnés à GST ainsi que les protéines purifiées Cdk5 et p35 avec une étiquette poly-Histidine a été effectué. Un contrôle de surnageant a été pris au temps zéro du pull-down afin que confirmer que les protéines poly-Histidine étaient bel et bien présentes dans chacune des conditions. La figure 11A montre, dans deux expériences de pull-down différentes, aucune ou une faible interaction de Cdk5 avec GST seule, les boucles intracellulaires du DOP ICL1, ICL2 ainsi que la queue C-terminale. Par contre, une forte interaction de Cdk5 avec la troisième boucle intracellulaire du récepteur DOP est observée. De plus, en parallèle, la même expérience en utilisant différents mutants du site de phosphorylation de Cdk5 sur la deuxième boucle intracellulaire du DOP (Xie et al., 2009 ; Chen et al., 2012 ; Beaudry et al., 2015) et la protéine purifiée Cdk5 avec l'étiquette poly-Histidine (figure 11B). La rationnelle de tester ces mutants en même temps vient de notre hypothèse initiale que le complexe Cdk5/p35 interagit sur la deuxième boucle intracellulaire du DOP tout près, en amont ou en aval, du site de phosphorylation de Cdk5 sur le DOP (Thr161). Trois mutants ont été testés, soit T161A, T161D et T161E. Les mutations en acide aspartique (D) et acide glutamique (E) servaient à voir si une mutation phosphomimétique, c'est-à-dire qu'un acide aminé avec une charge négative est inséré, pouvait altérer la liaison de Cdk5 et p35 sur le DOP. Lorsque la thréonine-161 est remplacée par un acide glutamique (T161E), on observe une liaison de Cdk5 seulement avec ce mutant. Dans le cas de la protéine purifiée p35 avec une étiquette poly-Histidine, aucune expérience n'a montré de liaison spécifique que ce soit sur la GST seule ou les différents domaines intracellulaires du DOP (résultats non-montrés). Un problème lors de la purification de p35 est peut-être en cause, mais nous avons préféré nous concentrer sur la liaison de Cdk5 au DOP. Puisque Cdk5 phosphoryle sur la deuxième boucle intracellulaire et que les résultats suggèrent une liaison sur la troisième boucle intracellulaire du DOP, on s'est ensuite intéressé à l'impact de la phosphorylation de Cdk5 sur les interactions de Cdk5, p35 et COPI avec DOP.

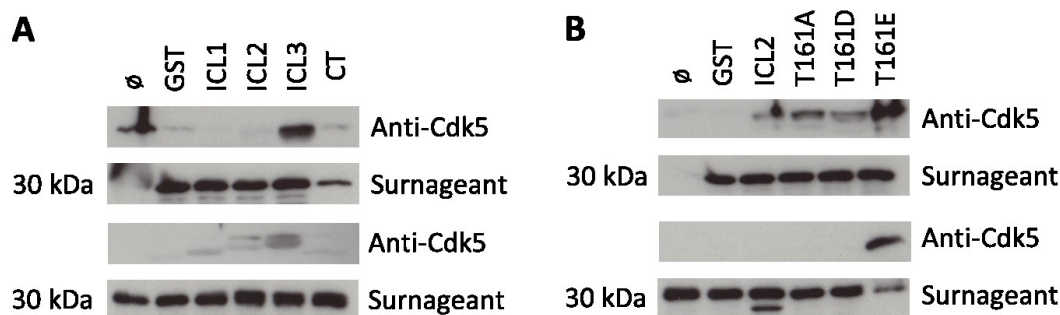


Figure 11 : Liaison de Cdk5 (A) à la troisième boucle intracellulaire du DOP et (B) au mutant T161E de la deuxième boucle intracellulaire. Les essais de GST pull-down ont été effectués avec la protéine purifiée Cdk5 avec une étiquette poly-Histidine. Chaque panneau présente deux expériences indépendantes, soit la réaction de pull-down et son contrôle de surnageant. Les protéines précipitées poly-Histidine ainsi que le surnageant ont été détectés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique contre Cdk5. Les résultats sont représentatifs d'au moins 6 expériences indépendantes (A) et 2 expériences indépendantes (B).

3.3 : Cdk5, en présence de son activateur p35, diminue l'interaction de COPI au DOP

Puisque le site de phosphorylation de Cdk5 sur le DOP chevauche un des sites de liaison de COPI sur la deuxième boucle intracellulaire du DOP, il était intéressant de tester quel effet l'activation de Cdk5 par p35 avait sur l'association de COPI avec le DOP. Des essais de co-immunoprécipitation ont donc été effectués en présence d'un autre partenaire connu du récepteur, COPB1, la sous-unité beta du complexe COPI (figure 12). D'un côté, p35-myc (figure 12A) a été transfectée en présence du Cdk5 endogène et de COPB1-myc transfecté dans des cellules HEK293 exprimant de façon stable le FlagDOP. De l'autre côté, COPB1-myc et Cdk5-HA sont transfectées alors que p35-myc est absent (figure 12B), donc Cdk5 ne devrait pas être activée même si elle est surexprimée (en plus de l'endogène), ce qui signifie que le DOP ne sera pas phosphorylé et donc que la liaison de COPI ne sera pas empêchée. Le récepteur FlagDOP a ensuite été immunoprécipité à l'aide d'un anticorps FlagM2 et les interactions de COPB1-myc, p35-myc et Cdk5 ont été détectées à l'aide d'anticorps contre leurs étiquettes moléculaires (myc-Hrp) ou la protéine elle-même (Cdk5). Tout d'abord, dans la figure 12A, l'interaction entre p35-myc et FlagDOP est observée, tout comme celle entre COPB1-myc et FlagDOP. Par contre, lorsque p35-myc et COPB1-myc sont coexprimées, l'interaction entre COPB1-myc et FlagDOP est fortement diminuée. De l'autre côté, en absence de son activateur spécifique neuronal p35, on voit que les interactions

de Cdk5 et COPB1 avec le DOP ne semblent pas modifiées (figure 12B). Par contre, c'est une expérience qui n'a été produite qu'une seule fois et à la figure 12B, aucune interaction entre Cdk5-HA et FlagDOP n'est observée dans la condition où seule Cdk5-HA est surexprimée, interaction que l'on obtient normalement à chaque expérience. Donc, bien que ces résultats supportent l'hypothèse que lorsque Cdk5 est en présence de son activateur p35, elle va phosphoryler le DOP au niveau de l'ICL2 et bloquer la liaison de COPI à ce site chevauchant la séquence de phosphorylation, l'expérience devra être répétée pour en tirer des conclusions précises. De plus, avec cette expérience, il est impossible d'affirmer si Cdk5 est bel et bien activée par p35, ni si le DOP est phosphorylé par la Cdk5.

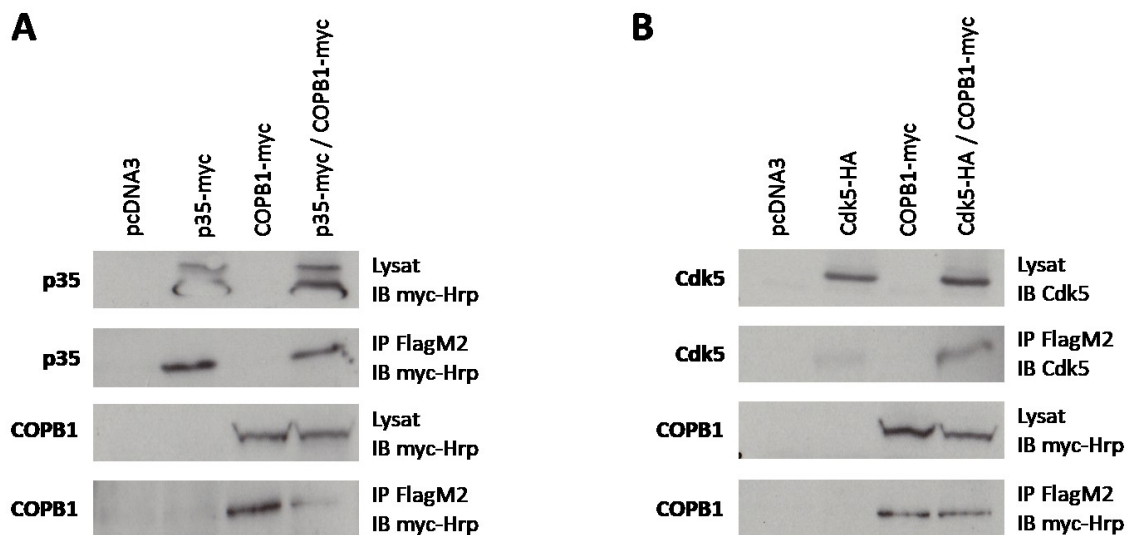


Figure 12 : L'interaction entre COPB1 et DOP est diminuée lorsque la Cdk5 endogène est en présence de p35. (A) Les constructions p35-myc et COPB1-myc sont transfectées pendant 48h dans des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur FlagDOP. Le récepteur DOP est immunoprécipité avec un anticorps contre son étiquette Flag et les protéines sont révélées par immunobuvardage à l'aide d'anticorps contre leurs étiquettes myc-Hrp. **(B)** Cdk5 est surexprimée (Cdk5-HA), alors que son activateur p35 est absent. Cdk5-HA est détectée avec un anticorps contre Cdk5. Résultat préliminaire (n=1).

3.4 : Effet de l'inhibition de l'expression de Cdk5 et COPB1 par des DsiRNAs sur l'expression de surface du FlagDOP par ELISA

Une nouvelle approche fut utilisée afin de vérifier l'impact que pouvait avoir l'absence de Cdk5 ou COPB1 sur les différentes interactions avec le récepteur opioïde delta. Pour ce faire, des petits ARNs interférents avec comme substrat Dicer, DsiRNA, qui sont

transfectés dans les cellules, diminuant l'expression du gène ciblé qui, dans ce cas-ci, est soit Cdk5 ou COPB1 (figure 13). Deux différents DsiRNAs ont été utilisés contre Cdk5 sur des cellules HEK293T transfectées avec l'agent transfectant TransIT-LT1 (A), des cellules HEK293 exprimant FlagDOP de façon stable (B) et finalement deux DsiRNAs contre COPB1 sur des cellules HEK293T (panneau du haut) et HEK293 stables pour FlagDOP (panneau du bas) (C). Dans la figure 13A, l'expression de Cdk5 endogène et surexprimée (Cdk5-HA) est détectée par des anticorps HA-Hrp et Cdk5. L'effet de deux DsiRNA différents contre Cdk5 est observée, avec un DsiCTRL servant de contrôle pour ces outils puisque c'est une séquence qui n'est pas reconnue par quoi que ce soit. Une inhibition est observée pour le DsiRNA Cdk5 #2 (figure 13A) autant sur la Cdk5 endogène que surexprimée, mais aucune inhibition est observée pour le DsiRNA Cdk5 #1. Avec l'anticorps contre Cdk5, on observe deux bandes puisque la Cdk5 est présente de façon endogène dans ces cellules (bande inférieure à environ 30 kDa) alors que la Cdk5-HA surexprimée possède une étiquette HA, expliquant pourquoi elle est détectée un peu plus haut (autour de 35 kDa). La même inhibition avec le deuxième DsiRNA Cdk5 est observée sur les niveaux endogènes de Cdk5 dans les cellules HEK293 exprimant le FlagDOP de façon stable (figure 13B). À la figure 13C, deux DsiRNA contre COPB1 ont été testés sur des cellules HEK293T (panneau supérieur) et sur des cellules HEK293 exprimant le FlagDOP de façon stable (panneau inférieur). Dans les deux types de cellules, une inhibition du COPB1 endogène est observée et ce pour les deux DsiRNA COPB1. Ces résultats ont permis de valider que nos outils sont fonctionnels, principalement le DsiRNA Cdk5 #2 et le DsiRNA COPB1.1, et prêts à être utilisés dans des expériences pour vérifier l'impact qu'une diminution de l'expression de ces deux protéines pourraient avoir sur l'expression de surface du DOP.

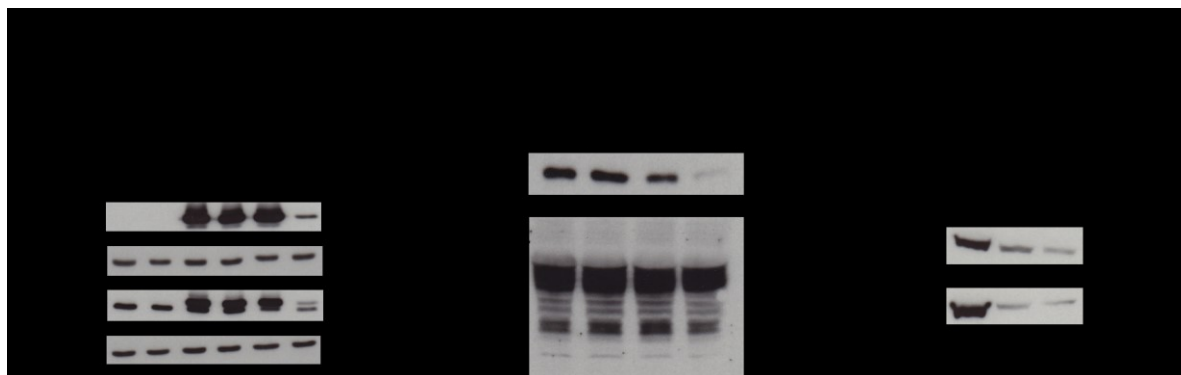


Figure 13 : Validation des dsiRNAs contre Cdk5 et COPB1 dans différentes cellules HEK293. Les cellules sont traitées avec le dsiRNA (50 nM) pendant 72h. La construction Cdk5-HA est exprimée pendant 48h dans des cellules HEK293T.

Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le FlagDOP ont été utilisées en B alors qu'en C, des HEK293T (C ; haut) et des HEK293 stables pour FlagDOP (C ; bas) ont été utilisées. Résultats représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes (A) et préliminaires (n=1 ; B et C).

L'expression de surface du récepteur opioïde delta a été quantifiée par ELISA où chaque condition était comparée au contrôle représenté par le récepteur FlagDOP exprimé de façon stable dans des cellules HEK293 traitées avec le DsiCTRL et transfectées avec l'agent TransIT-LT1 avec le vecteur pcDNA3 (figure 14). Ce contrôle représente une valeur arbitraire établie par nous de 100%, donc un nombre supérieur à 100% représente une augmentation de l'expression du DOP à la surface de la cellule tandis qu'un nombre inférieur représente une baisse. Les constructions pcDNA3, p35-myc, COPB1-myc et la coexpression de p35-myc avec COPB1-myc ont toutes été transfectées avec l'agent TransIT-LT1 dans des cellules HEK293 exprimant de façon stable le FlagDOP. Ces cellules ont été traitées soit avec un DsiCTRL ou un DsiRNA Cdk5 pour 72h. L'objectif est de comparer la différence d'expression de surface du DOP lorsque l'expression de Cdk5 est diminuée par son DsiRNA comparé au DsiCTRL. En condition normale, soit sans l'ajout de DsiRNA, aucune différence notable entre le récepteur seul, avec p35 (donc Cdk5 potentiellement activée), COPB1 seul ou avec p35 et COPB1 est observée lorsque ceux-ci sont transfectés avec le DsiCTRL, qui est reconnu par aucune séquence et donc ne devrait pas changer l'expression. L'expression de surface du FlagDOP varie de 100,0% pour la condition contrôle (pcDNA3 avec DsiCTRL) à 112,4% \pm 9,5 pour la condition où p35-myc et COPB1-myc sont coexprimées (figure 14). Par contre, lorsqu'on inhibe l'expression de Cdk5 avec le DsiRNA #2, on observe une baisse significative de l'expression de surface du récepteur FlagDOP, variant de 73.6 \pm 13,5 pour la condition contrôle à 66.6% \pm 7,1 pour la condition où p35-myc et COPB1-myc sont coexprimées, mais encore une fois aucune différence lorsque les conditions ayant reçu le DsiRNA sont comparées entre elles.

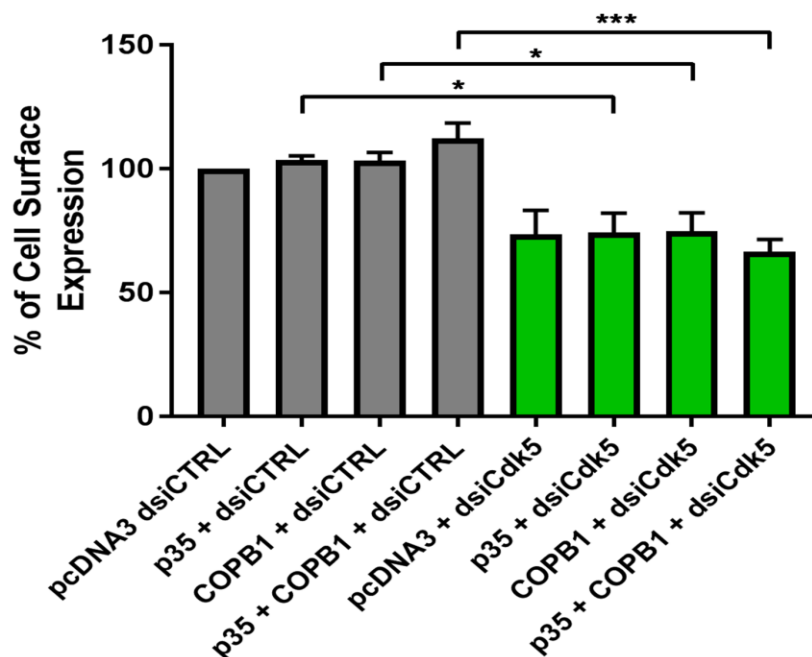


Figure 14 : Effet de Cdk5 dans la régulation de l'expression de surface du récepteur opioïde delta. L'expression de surface a été mesurée sur des cellules HEK293 exprimant le récepteur DOP de façon stable par la méthode ELISA. Toutes les valeurs sont exprimées en pourcentage d'expression du FlagDOP à la surface. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen (SEM) de 4 expériences indépendantes (n=4). Le test statistique utilisé est le « one-way ANOVA » suivi du test de comparaison multiple de Dunnett (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). Figure créée avec GraphPad Prism 5.

Lorsque les conditions avec DsiCTRL sont comparées aux conditions avec DsiCdk5, des différences significatives dans l'expression de surface du FlagDOP sont observées (tableau 2). Tout d'abord, dans le cas où p35-myc est transfecté et donc potentiellement active le Cdk5 endogène, on observe une baisse significative passant de $103.7 \pm 2,1$ avec le DsiCTRL à $74.5\% \pm 11,0$ lorsque le DsiRNA Cdk5 est présent. Le même phénomène est observé dans le cas où la sous-unité beta du complexe COPI est transfectée ($103.3 \pm 5,4$ avec DsiCTRL à $74.8\% \pm 11,5$ avec DsiRNA Cdk5) ainsi que dans la condition où p35 et COPB1 sont présents ($112.4 \pm 9,5$ avec DsiCTRL à $66.6\% \pm 7,1$ avec DsiRNA Cdk5). L'effet de la déplétion de COPB1 sur l'expression de surface du DOP a également été analysé (tableau 2). Par contre, dû à des problèmes de cytotoxicité rencontrés au cours des diverses expériences, aucun des deux DsiRNAs testés précédemment (figure 7) n'ont pu être utilisés et ces expériences n'ont pu être répétées. En conclusion, ces résultats montrent une baisse significative sur l'expression de surface du DOP lorsque l'expression de Cdk5 est inhibée par un DsiRNA.

Constructions	Expression de surface (%)
HEK293 + pcDNA3 + dsiCTRL	BLANC
pcDNA3 + dsiCTRL	100,0 ± 0,0
p35-myc + dsiCTRL	103,7 ± 2,1
COPB1 + dsiCTRL	103,3 ± 5,4
p35-myc + COPB1-myc + dsiCTRL	112,4 ± 9,5
pcDNA3 + dsiCdk5 #2	73,6 ± 13,5
p35-myc + dsiCdk5 #2	74,5 ± 11,0
COPB1-myc + dsiCdk5 #2	74,8 ± 11,5
p35-myc + COPB1-myc + dsiCdk5 #2	66,6 ± 7,1
pcDNA3 + dsiCOPB1.5	46,8 ± 12,6
p35-myc + dsiCOPB1.5	41,9 ± 11,6
COPB1-myc + dsiCOPB1.5	45,3 ± 9,1
p35-myc + COPB1-myc + dsiCOPB1.5	42,1 ± 12,2

Tableau 2 : Effet des DsiRNAs sur l'expression de surface du récepteur opioïde delta. Les résultats sont exprimés en pourcentage et sont représentés graphiquement à la figure 14 à l'exception des résultats avec le DsiRNA COPB1. L'écart type moyen est exprimé en pourcentage. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur FlagDOP ont été utilisées pour toutes les conditions exceptées pour le blanc où des cellules HEK293 sans récepteur ont été utilisées.

3.5 : Projet connexe : interaction entre GASP-1 et le DOP

Dans mon deuxième projet concernant les protéines de triage endosomal potentiellement impliquées dans le trafic du DOP, 4 partenaires potentiels ont été identifiés, soit GASP-1, SNX1, NSF et NHERF-1. Tous ces partenaires ont été montré comme interagissant avec la queue C-terminale du DOP dans un modèle à double hybrides (Heydorn et al., 2007). Notre hypothèse est que les protéines GASP-1 et SNX1, en condition normale, viendraient interagir avec le DOP pour l'envoyer vers la voie lysosomale où il est dégradé. En condition inflammatoire où lors d'un traitement chronique à la morphine, les protéines NSF et NHERF-1 seraient plutôt impliqués dans le trafic du DOP, plus précisément dans son recyclage. Des essais d'immunoprécipitation du FlagDOP à l'aide d'un anticorps FlagM2 dans des cellules AD293 ont été effectués. La protéine GASP-1 avec l'étiquette moléculaire mCherry ainsi que le FlagDOP ont été transfectés par X-tremeGENE HP dans ces cellules et

détectés respectivement avec un anticorps mCherry et Flag polyclonal. Une interaction entre GASP-1-mCherry et FlagDOP a été observée (figure 15). Dans le cas des autres partenaires, SNX1, NSF et NHERF-1, malgré que les constructions avaient toutes été validées par immunobuvardage, des interactions entre ces 3 protéines et le DOP n'ont jamais été observées. En conclusion, la protéine GASP-1 surexprimée montre une interaction avec le DOP surexprimé dans des cellules AD293.

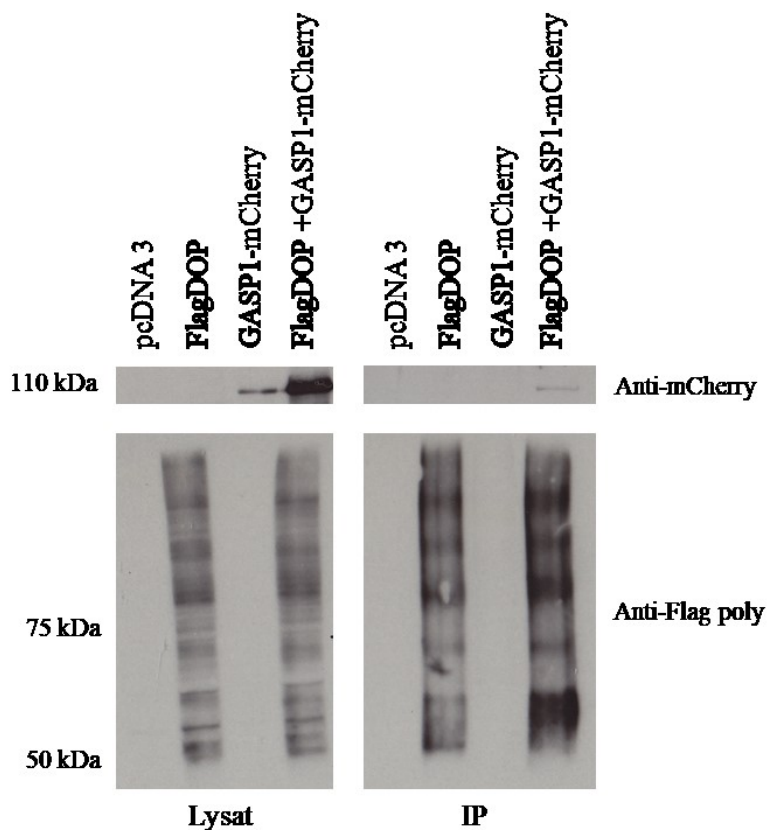


Figure 15 : La protéine GASP-1 interagit avec le récepteur opioïde delta par co-immunoprécipitation sur cellules AD293 transfectées. Des cellules HEK293 modifiées pour être plus adhérentes (AD293) ont été transfectées avec les constructions FlagDOP et/ou GASP-1-mCherry. Les cellules ont été lysées 48h post-transfection et l'immunoprécipitation a été effectuée avec l'anticorps FlagM2. La protéine GASP-1-mCherry et le récepteur FlagDOP sont détectées à l'aide des anticorps spécifiques contre leurs étiquettes moléculaires, mCherry et Flag (polyclonal) respectivement. Les panneaux de gauche représentent les contrôles récoltés avant l'immunoprécipitation tandis que les panneaux de droite représentent les résultats de l'immunoprécipitation. Résultats représentatifs d'au moins 2 expériences indépendantes.

4. Discussion

Dans le cadre de mes travaux de maîtrise, je me suis principalement intéressé aux interactions de divers partenaires avec le récepteur opioïde delta, de leur possible impact sur son trafic et sur la façon dont ces interactions sont modulées pour réguler l'adressage du DOP à la membrane plasmique. L'objectif principal relié à caractériser ces interactions est de mieux comprendre comment fonctionne les mécanismes entourant le trafic du DOP vers la surface de la cellule, d'identifier de nouvelles cibles et outils pharmacologiques qui ultimement vont permettre des avancées dans le développement de traitement contre la douleur. Chaque partenaire identifié est un pas de plus vers cet objectif et peut avoir un effet sur le routage du DOP. Parmi ceux-ci, je me suis intéressé dans un projet secondaire aux 4 partenaires identifiées par système à double hybride comme interagissant avec la queue C-terminale du DOP, soit les protéines GASP-1, SNX1, NSF et NHERF-1. Ce projet visait à voir l'effet d'un traitement prolongé à la morphine ou d'inflammation sur le rôle de ces différents partenaires dans le trafic du DOP. Mais tout d'abord, le projet principal de mes travaux de maîtrise, soit le rôle de Cdk5 dans le trafic du DOP. Le but de ce projet était d'étudier l'impact des interactions de Cdk5 et son activateur spécifique neuronal, p35, sur le trafic du DOP.

4.1 : Interactions de Cdk5 et p35 avec le DOP

Parmi les différents projets auxquels j'ai pu travailler, les interactions de Cdk5/p35 avec le DOP ainsi que la relation que peut avoir ce complexe sur l'interaction de COPI avec le DOP ont été le plus gros de mes recherches. L'interaction avec complexe COPI est déjà bien documentée dans la littérature, COPI liant différents motifs caractérisés par des motifs di-arginine (RxR), di-lysine (KxK) ou lysine/arginine (RxK, KxR) (Ma and Goldberg, 2013). Tel que montré par notre groupe (St-Louis et al., 2017), 13 de ces motifs sont présents dans la séquence du récepteur opioïde delta. Au niveau de la deuxième boucle intracellulaire du DOP, on retrouve un de ces sites di-lysine aux positions 164 à 166 (figure 11) et, ce qui est d'autant plus intéressant, c'est la présence d'une séquence consensus de phosphorylation par la kinase Cdk5 aux positions 161 à 164, chevauchant en partie le motif de liaison de COPI, partenaire d'interaction connu du DOP (St-Louis et al., 2017). Considérant la localisation

peu commune des récepteurs opioïdes delta au niveau intracellulaire, nous nous sommes demandés s'il y avait un lien entre ces partenaires et le trafic du DOP.

4.1.1 : Interaction de Cdk5 et p35 avec le DOP : une interaction dynamique?

Tout d'abord, il a été montré que p35-myc et Cdk5-HA interagissaient individuellement avec le récepteur FlagDOP. Par contre, lorsque coexprimés, l'interaction de ces protéines avec le récepteur est absente. Il est à noter que les protéines Cdk5 et p35 sont bel et bien présentes dans cette dernière condition, comme le démontre les 2 panneaux inférieurs de la figure 7, représentant les contrôles récoltés juste avant l'immunoprécipitation. De plus, malgré que des anticorps ciblant les étiquettes moléculaires de ces 2 partenaires étaient utilisés, il est important de spécifier que Cdk5 est présente de façon endogène dans les cellules HEK293, comme celles utilisées dans cette expérience, tandis que p35, son activateur spécifique neuronal, n'est pas présent dans ces cellules rénales (basé sur des résultats de spectrométrie de masse effectué sur les cellules HEK293 par Etienne St-Louis lors de sa maîtrise). Dans cette expérience, nous sommes donc dans des conditions de surexpression puisque toutes les constructions sont transfectées en plus des niveaux endogènes comme dans le cas de Cdk5. Cette perte d'interaction entre p35/FlagDOP et Cdk5/FlagDOP lorsque p35 et Cdk5 sont coexprimés est une découverte en soi et n'a donc pas d'explication dans la littérature à ce jour. Parmi les hypothèses qui sont à considérer, il y a tout d'abord le fait que la présence de p35, qui active Cdk5 et permet donc son activité kinase, permet la phosphorylation de Cdk5 sur la deuxième boucle intracellulaire du DOP au niveau de la Thr161. En effet, ce processus très dynamique agirait comme une interaction « kiss and run », soit la Cdk5 qui viendrait phosphoryler le DOP sur la Thr161 pour ensuite se détacher et ne plus interagir avec le DOP. On sait que pour être constitutivement active, Cdk5 a besoin d'être activée par p35 et est inactive lorsque son activateur est absent ou se dissocie (Takahashi et al., 2019), ce qui supporte d'autant plus le potentiel de l'hypothèse du « *kiss and run* ».

4.1.2 : Validation des interactions dans un modèle de cellules neuronales

Puisque l'activateur de Cdk5, p35, est spécifique aux neurones, le but était de vérifier si la même expérience pouvait être reproduite dans un modèle de cellules neuronales, soit les NG108-15, un hybridome entre un neuroblastome de souris et un gliome de rat (figure 8). L'objectif de tester dans ces cellules était de déterminer si des effecteurs ou des conditions supplémentaires présents uniquement au niveau neuronal étaient nécessaires pour que ces interactions aient lieu. Puisque Cdk5 possède des rôles à ce niveau et que son activateur p35 est spécifique au niveau des neurones, nous voulions reproduire un modèle se rapprochant de la réalité. Malheureusement, selon des résultats de spectrométrie de masse obtenus avec ces cellules dans notre laboratoire, Cdk5 serait exprimée de façon endogène, mais ni ces résultats ou la littérature peuvent confirmer si p35 est aussi présente. Nous avons tout de même poursuivi l'expérience au cas où l'interaction, au niveau physiologique, requiert des éléments autres qui ne seraient pas présents dans des cellules HEK293, mais présents dans les NG108-15. Le même résultat que celui obtenu dans les HEK293, soit l'interaction entre Cdk5/FlagDOP et la perte de cette interaction lorsque p35 et Cdk5 sont coexprimées ont été observés lorsqu'un anticorps contre l'étiquette HA de Cdk5 était utilisé. Par contre, lorsque la détection de l'interaction entre p35 et DOP était observée, le même résultat n'a pu être observé, tout comme la perte d'interaction lorsqu'elles sont coexprimées en détectant p35-myc. Puisque ce ne sont pas les mêmes cellules, il y a forcément de l'optimisation à faire sur la façon de transfecter, que ce soit les ratios ADN/transfection ou l'agent transfectant à utiliser, ce qui pourrait expliquer ce résultat. Encore une fois, toutes les constructions, soit Cdk5-HA, p35-myc et FlagDOP, sont transfectées puisque les anticorps ciblant les protéines endogènes ne fonctionnaient pas encore. Finalement, nous avons décidé de poursuivre dans le modèle de cellules HEK293, considérant que p35 était aussi absent de façon endogène dans les NG108-15 et qu'aucun des anticorps contre p35 ne semblait fonctionner, contrairement à ceux contre Cdk5 qui se sont avérés très efficaces plus tard dans mes recherches. C'est pour cette raison que nous n'avons pas essayé de répéter l'expérience pour le moment, donc ce résultat demeure préliminaire et représente une avenue intéressante pour le futur du projet, tout en prenant pour acquis qu'il y a encore de l'optimisation à faire à ce niveau.

4.1.3 : Cdk5 et p35 forment un complexe

Maintenant que les interactions de chacun des partenaires avec le DOP ont été mises en évidence, il était intéressant de savoir si ceux-ci interagissaient ensemble. Tout d'abord, dans une expérience exploratoire, l'interaction entre p35 et Cdk5 ensemble, sans la présence de DOP, a été vérifiée par co-immunoprécipitation. En rappel, le principe de la co-immunoprécipitation est d'immunoprécipiter ou de « pêcher » une protéine A à l'aide d'anticorps spécifiques à celle-ci qui sera attaché à des billes. Ensuite, on s'intéresse à savoir si certaines protéines vont être entraînées avec cette protéine A, suggérant une interaction. Pour ce faire, des anticorps ciblant la protéine B sont utilisés, par exemple, et si un signal est obtenu dans l'immunobuvardage de l'immunoprécipitation, cela signifie une interaction entre ces deux protéines. Tout d'abord, il fallait vérifier si Cdk5-HA et p35-myc interagissaient ensemble à l'aide d'anticorps dirigés contre leurs étiquettes moléculaires (figure 9). Lorsque p35-myc ou Cdk5-HA était immunoprécipitée, interaction avec l'autre protéine était obtenue (p35-myc ou Cdk5-HA), indiquant que p35 et Cdk5 formaient un complexe lorsque coexprimées (figure 9A). On sait maintenant que Cdk5 et p35 interagissent individuellement avec le DOP, n'interagissent plus avec celui-ci lorsque coexprimées, et interagissent ensemble pour former un complexe. Nous voulions donc savoir si la présence du récepteur pouvait altérer cette interaction. L'expérience a donc été répétée en présence du récepteur opioïde delta et, encore une fois, une interaction entre ces deux partenaires a été observée. Nous pourrions ici supposer qu'il n'y a pas de compétition entre les trois, mais plutôt que p35 lie Cdk5 pour l'activer, puis le complexe interagit avec le DOP au niveau de la deuxième boucle intracellulaire pour phosphoryler la Thr161 pour finalement se dissocier, d'où l'hypothèse du « *kiss and run* ». De plus, le groupe du Pr Pant a démontré que Cdk5 interagissait avec trois domaines sur p35 pour être activé et que cette activation se fait en deux temps. En effet, une première activation rapide et réversible survient lorsque Cdk5 lie un ou deux domaines de p35, suivi d'une stabilisation lente vers une conformation active lorsque les 3 domaines sont liés (Amin et al., 2002). Ces résultats concorderaient avec notre hypothèse de « *kiss and run* », compte tenu d'une interaction rapide et dynamique entre Cdk5 et p35, puis vient la phosphorylation du DOP et finalement le complexe Cdk5/p35 se dissocie vu l'activation lente et réversible. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'état de phosphorylation du DOP en présence de ces deux protéines coexprimées

ou seules. Un autre moyen serait d'effectuer des essais kinase afin de vérifier efficacement que Cdk5 est bel et bien activée par p35 et ajouter à cela un anticorps phospho-Thr161 pour confirmer que la Cdk5 active phosphoryle le DOP. Une autre avenue intéressante serait de vérifier à partir de quel ratio d'ADN de p35 et Cdk5 le complexe est créé. En effet, en utilisant des quantités croissantes d'ADN de p35 lors de la transfection avec des quantités fixes de Cdk5 et DOP, nous pourrions évaluer à quel moment il y a suffisamment de p35 pour activer Cdk5, phosphoryler le DOP et ainsi bloquer le site de liaison de COPI. Considérant qu'il y a du Cdk5 exprimée de façon endogène dans toutes les lignées cellulaires que nous avons utilisées, une perte d'interaction aurait dû être observée sans transfecter davantage de Cdk5. La quantité et l'affinité de p35 et Cdk5 semblent avoir un impact sur leurs interactions ensemble et avec le DOP, alors cette avenue serait très intéressante à vérifier dans le futur.

4.2 : Identification du domaine d'interaction de Cdk5 et p35 sur le DOP

4.2.1 : Prédiction et mutation d'un site potentiel d'interaction par ELM

La suite logique était maintenant d'identifier le site d'interaction de ces partenaires sur DOP. On sait que la séquence consensus de phosphorylation de Cdk5, soit S/T-PXK/R où X représente n'importe quel acide aminé (Sharma et al., 1999), se retrouve au niveau de la deuxième boucle intracellulaire du DOP (T161-P-A-K164). Par contre, cela ne signifie pas que c'est à cet endroit que Cdk5 lie le DOP. En effet, à l'aide d'un outil de recherche identifiant des sites potentiels d'interaction selon la séquence appelé Eukaryotic Linear Motif ou ELM (<http://elm.eu.org/>), un ancien étudiant du laboratoire, Étienne St-Louis, a pu prédire un site potentiel où une cycline pouvait lier sur le DOP (tableau 3).

Nom ELM	Séquence	Positions	Description ELM.	Compart. cell.
DOC_CKS1_1	FRTPAK	159-164	Motif phospho-dépendant qui régule la liaison des substrats et régulateurs de la CDK sur le Cks1 lié au complexe cycline-Cdk	Noyau, cytosol
DOC_CYCLIN_1	KYLM KALDF	108-111 155-159	Site de reconnaissance du substrat qui interagit avec la cycline, ce qui augmente la phosphorylation par le complexe cycline/Cdk. Les protéines prédites doivent avoir un site de phosphorylation de Cdk. Ce site est aussi utilisé par les inhibiteurs du complexe cycline/Cdk.	Noyau, cytosol

Tableau 3: Prédiction effectuée par l'outil de recherche Eukaryotic Linear Motif sur la séquence FASTA de récepteur opioïde delta de rat. Séquence de la protéine OPRD_RAT en FASTA, sans spécifier de compartiment cellulaire ciblé et recherche faite dans le rat (*Rattus norvegicus*) avec une probabilité de coupure de 100 (tableau adapté traduit de l'outil ELM).

En effectuant une recherche avec la séquence du DOP de rat, l'outil ELM prédit plusieurs sites potentiels de différentes interactions à l'intérieur de la séquence complète du DOP. Parmi ceux-ci, on retrouve deux sites potentiels répondant à ce que nous cherchions, soit des sites de Cdk5 ou de p35 qui, rappelons-le, est une *cyclin-like*. Comme observé dans le tableau 3, le premier site prédit correspond à la séquence consensus de phosphorylation de Cdk5, soit TPAK aux positions 161 à 164, mais pour Cks1, une sous-unité des kinases Cdk principalement impliquée dans la modulation du cycle cellulaire, la transcription et les voies de signalisation liées à la croissance (Khattar and Thottassery, 2013). Bien que cet outil ne discrimine pas directement le site de phosphorylation de Cdk5 sur le DOP, il est bien connu dans la littérature que Cdk5 phosphoryle cette séquence consensus ((S/T) PX (K/H/R)) de phosphorylation (Beaudette et al., 1993 ; Lew et al., 1994 ; Tsai et al., 1994 ; Songyang et al., 1996 ; Amin et al., 2002) et qu'elle phosphoryle le DOP au niveau de la Thr161 (Xie et al., 2009 ; Beaudry et al., 2015). L'autre prédiction est très intéressante puisqu'elle se retrouve en amont du site de phosphorylation, soit aux positions 155 à 159. Cette séquence d'acides aminés, K-A-L-D-F, serait prédite à un site de reconnaissance des cyclines ce qui aurait pour effet d'augmenter la phosphorylation causée par le complexe cycline/Cdk. Dans notre cas, p35 agit comme une « *cyclin-like* » et forme un complexe avec Cdk5 comme montré précédemment. Il est aussi important de noter que Cdk5 est un membre particulier de

la famille des Cdk5, du fait qu'il n'est pas impliqué dans le cycle cellulaire en plus d'être actif seulement dans les cellules neuronales (Sharma et al., 1999). Néanmoins, la possibilité que p35 ou même Cdk5 lie à cet endroit en amont du site de phosphorylation sur la deuxième boucle intracellulaire du DOP demeure très plausible. Des mutants de cette séquence ont été faits, soit des mutations simples en alanine (K155A, L157A) et des mutations multiples aussi en alanine (K155-157A, K155-159A). Ensuite, des essais de co-immunoprécipitation avec p35 et Cdk5 sur les mutants du DOP ont été effectués et comparés au type sauvage afin de voir si les mêmes interactions étaient encore obtenues lorsque les sites étaient mutés (résultats non-montrés). Le clonage des différents mutants a été réussi pour les mutants K155A, L157A, K155-157A, mais, après plusieurs expériences infructueuses, une vérification du séquençage du quadruple mutant K155-159A s'est avérée être défectueuse, c'est-à-dire que ce n'était même plus le DOP dû à l'insertion de nouvelles mutations lors du clonage. Malheureusement, aucune différence notable entre les différents mutants et le type sauvage a été observée. Résultant d'au moins 3 expériences indépendantes, si l'on exclut le mutant K155-159A puisque sa séquence mutée n'était pas exacte, nous obtenions encore des interactions de Cdk5 et p35 avec les mutants, supportant que ce n'est pas le site d'interaction de ces deux protéines. Nous devons donc modifier notre approche pour identifier le site d'interaction de ces protéines.

4.2.2 : Identification du site d'interaction par essais de « pull-down »

Le fait de tester ces mutants en premier lieu nous faisait prendre pour acquis que ces protéines liaient le DOP au niveau de la deuxième boucle intracellulaire. Tout ce qui est connu, c'est que le site de phosphorylation est à ce niveau. Donc il fallait confirmer si l'interaction se faisait bel et bien à ce niveau ou si c'était ailleurs sur le DOP. La façon la plus simple était d'effectuer des essais de « pull-down » des différents domaines du DOP, soit les trois boucles intracellulaires et la queue C-terminale, sur des lysats contenant Cdk5 ou p35. Pour ce faire, chaque domaine du DOP a été fusionné à la protéine de fusion GST puis, par un principe semblable à l'immunoprécipitation, chacun des domaines-GST est incubé avec des lysats provenant de cellules ayant été transfectées avec Cdk5-HA ou p35-myc. Ensuite, par immunobuvardage à l'aide d'anticorps ciblant les étiquettes de ces protéines, les protéines sont détectées. Par exemple, si un signal est obtenu avec une boucle

précise, par exemple ICL2, et aucun signal ailleurs, cela signifierait que la protéine en question interagit au niveau de ce domaine intracellulaire. Après plusieurs essais sur lysats cellulaires, nous n'obtenions pas de résultats significatifs (figure 10). Les résultats variaient beaucoup d'une expérience à l'autre en plus d'avoir souvent des liaisons non-spécifiques sur nos conditions contrôles telle GST seule. La possibilité que quelque chose vienne interférer avec les interactions dans les lysats cellulaires n'est pas à écarter. Par contre, dans des cellules HEK293 exprimant le FlagDOP de façon stable, en immunoprécipitation, des interactions étaient observées, confirmant du même coup que Cdk5 et p35 lient à quelque part sur le DOP. Dans ce cas-ci, seuls les domaines intracellulaires du DOP fusionnés à la GST sont utilisés et non le récepteur DOP complet comme dans ces cellules. Évidemment, nous ne pouvions pas utiliser ces cellules HEK293 stables pour le FlagDOP pour ne pas interférer avec le but de l'expérience, soit d'identifier sur quel domaine intracellulaire du DOP ces protéines se lient. De plus, le fait que nous avons omis de faire une courbe standard de BSA lors de la première purification des différents domaines faisait en sorte que nous utilisions des volumes estimés qualitativement afin d'obtenir une expression semblable entre les différentes conditions plutôt qu'une quantité précise de protéine. Le but préliminaire de cette expérience était avant tout d'identifier s'il y avait clairement une interaction avec un domaine intracellulaire en particulier de façon qualitative plutôt que quantitative. Afin d'améliorer nos chances d'identifier le site d'interaction, nous avons décidé d'opter pour une autre approche, soit la fusion de nos protéines d'intérêt sur une étiquette poly-histidine. L'avantage de cette méthode comparé au GST « pull-down » sur lysat cellulaire est que l'on peut vérifier l'interaction de Cdk5-His ou p35-His avec les différents domaines intracellulaires, sans avoir autre chose pouvant modifier celle-ci, comme dans le cas d'un lysat cellulaire. Une situation où cela pourrait nuire, c'est si une interaction est indirecte et requiert la présence de plus d'un facteur ou d'une modification post-traductionnelle au niveau de la séquence, ce qui ne pourrait pas être observé dans cette expérience. Dans le cas des interactions de Cdk5 et p35 sur le DOP, il n'est pas connu si celles-ci nécessitent la présence d'autres protéines, d'où l'intérêt de cette expérience. Des étiquettes poly-Histidine ont donc été ajoutées aux protéines Cdk5-HA et p35-myc. Par cette méthode, le site potentiel d'interaction de Cdk5 au DOP a pu être identifiée, qui semblerait être au niveau de la troisième boucle intracellulaire du DOP (figure 11A). Ces résultats étaient plutôt surprenants puisque nous nous attendions à une

liaison au niveau de la deuxième boucle intracellulaire du DOP, tout près du site de phosphorylation par exemple. Ceci écarterait du même coup la prédiction faite par ELM, qui liait la cycline en amont du site de phosphorylation aux positions 155 à 159. Dans ce cas-ci, les résultats avec p35-His ne sont pas montrés puisque nous doutions de la validité de la construction. Des liaisons non-spécifiques étaient obtenues ou aucun signal n'était observé, ce qui nous a fait douter de la validité de la construction lors de l'ajout de l'étiquette poly-Histidine. C'est pourquoi nous avons décidé de continuer uniquement avec Cdk5 et de concentrer nos efforts sur son site d'interaction, étant inconnu dans la littérature à ce jour. L'idée que Cdk5 se lie sur la troisième boucle intracellulaire du DOP est en fait très plausible. En effet, lorsqu'on regarde la structure tridimensionnelle d'un récepteur couplé aux protéines G, la proximité entre les boucles intracellulaires 2 et 3 est telle que Cdk5 pourrait logiquement lier l'ICL3 et phosphoryler une séquence consensus de l'ICL2. Après avoir obtenu une interaction de Cdk5 avec la troisième boucle intracellulaire à plusieurs reprises, nous avons continué nos expériences avec cette nouvelle hypothèse en tête. En parallèle avec cette expérience, un « pull-down » entre des mutants du site de phosphorylation de Cdk5 sur l'ICL2 et Cdk5 purifiée a aussi été fait. Puisque notre hypothèse de départ était que Cdk5 liait sur la deuxième boucle intracellulaire du DOP, nous voulions voir l'effet qu'auraient ces mutants phosphomimétiques (T161D et T161E) et en alanine (T161A) (figure 11B). L'objectif d'utiliser ces mutants était de voir si l'ajout d'une charge négative pouvait mimer le groupe phosphate comme si le DOP était phosphorylé et donc influencer la liaison de Cdk5 aux différents domaines intracellulaires du DOP. Selon les résultats préliminaires de deux expériences indépendantes, Cdk5 ne semble lier que le mutant T161E. Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus par le « pull-down » sur les différents domaines, montrant une liaison de Cdk5 avec la troisième boucle intracellulaire, et non la deuxième boucle intracellulaire du DOP. De plus, si cette liaison était causée par la charge négative de la mutation T161E, la même observation aurait dû être observée avec l'autre mutant phosphomimétique T161D. Une expérience préliminaire d'immunoprécipitation du DOP menée par Etienne St-Louis en utilisant le mutant T161A a montré que Cdk5 interagissait toujours avec le DOP malgré la mutation (n=1). Cette expérience, bien qu'elle doive être reproduite, vient supporter nos résultats obtenus qui suggèrent que Cdk5 lierait au niveau de la troisième boucle intracellulaire du DOP et, lorsqu'activée par son activateur spécifique

neuronal p35, viendrait phosphoryler la Thr161 au niveau de la deuxième boucle intracellulaire du DOP.

4.3 : Liaison de COPB1 au DOP : l'activation de Cdk5 empêche-t-elle celle-ci?

Puisqu'il a été déterminé que Cdk5 et p35 lient le DOP, tout comme COPB1, et qu'un des sites de liaison de COPI chevauche le site de phosphorylation de Cdk5, il fallait maintenant établir si cette phosphorylation bloquait bel et bien l'interaction. Une immunoprécipitation du récepteur FlagDOP à l'aide d'un anticorps Flag a été faite en présence de p35-myc, COPB1-myc et/ou Cdk5-HA (figure 12). Le but de cette expérience était de voir si Cdk5, en présence de son activateur p35, et donc avec son activité kinase active pour phosphoryler le DOP, pouvait modifier l'interaction de la sous-unité COPB1 avec le DOP. Comme on peut le voir à la figure 12A, où il y a du p35-myc transfecté qui, théoriquement, active Cdk5 endogène, on observe les interactions entre p35/DOP et COPB1/DOP, mais lorsque p35 et COPB1 sont coexprimées, seule l'interaction entre p35/DOP est conservée tandis que celle entre COPB1/DOP est diminuée. Supportant du même coup cette théorie, à la figure 12B, lorsque p35 n'est pas présent, puisqu'il n'est pas exprimé de façon endogène dans les cellules HEK293, l'interaction entre COPB1 et DOP est maintenue puisque Cdk5 n'est pas active. Notre hypothèse que la phosphorylation du DOP par Cdk5 viendrait bloquer la liaison de COPI semble supportée par cette expérience. De plus, on pourrait être porté à croire que cette phosphorylation pourrait bloquer l'accès au site de liaison COPI (Lys164-X-Lys166), soit par encombrement stérique ou par la formation d'un lien phosphoramidate entre la charge positive de la lysine et la charge négative du groupement phosphate (PO_4^{3-}). Cette dernière hypothèse est probablement la moins probable considérant que les interactions et que le trafic du DOP sont très dynamiques et qu'un lien chimique viendrait débalancer cet équilibre. L'idée demeure la même, soit que la phosphorylation du DOP par Cdk5 sur la deuxième boucle intracellulaire viendrait empêcher le complexe COPI de lier le DOP et ainsi réduire la rétention du récepteur à l'intérieur de la cellule. Par contre, il était impossible de conclure si le DOP est phosphorylé ni que la Cdk5 est bel et bien activée. Pour ce faire, il faudrait effectuer des essais d'activité kinase avec l'histone H1 ainsi qu'obtenir un anticorps phospho-Thréonine (Xie et al., 2009). De cette façon, nous pourrions évaluer adéquatement

lorsque le récepteur DOP est phosphorylé et, par conséquent, Cdk5 activée. Du même coup, les niveaux de p35 nécessaires à l'activation de Cdk5 pourront aussi être déterminés en observant la phosphorylation du DOP. L'hypothèse d'une compétition entre p35 qui active Cdk5 et COPI qui se lie à son site sur l'ICL2 selon les niveaux présents est aussi plausible et à vérifier par des essais kinase via la phosphorylation du DOP.

Une étude a aussi montré que, non seulement la Thr161 est importante pour la phosphorylation, mais la Lys164 est aussi nécessaire pour que celle-ci ait lieu (Xie et al., 2009). En effet, grâce à des essais kinase comparant la deuxième boucle intracellulaire du DOP à différents mutants, soit T161A et K164N, ainsi que la deuxième boucle intracellulaire du MOP, ils ont observé avec un anticorps phospho-Thr161 que seul l'ICL2 du DOP est phosphorylé. Ces résultats supportent l'importance de la séquence de phosphorylation complète et donc renforcent du même coup notre hypothèse d'un lien entre Cdk5 et COPI considérant que cette Lysine fait partie du site de liaison de COPI. Il est aussi important de noter que cette séquence de phosphorylation n'est pas conservée dans les autres récepteurs opioïdes tel le MOP (TPRN plutôt que TPAK du DOP). Allant dans le même sens, Etienne St-Louis avait observé une diminution de la liaison de COPB1 au DOP en présence des différents mutants T161A, D ou E. Malgré ces résultats concordants, le fait qu'on ne peut pas confirmer que Cdk5 est bel et bien activée dans ce cas-ci par p35 et que le récepteur opioïde delta est phosphorylé rend difficile de tirer des conclusions claires pour le moment, mais plutôt d'orienter nos hypothèses en ce sens pour le moment. Les mécanismes précis de ces interactions étant toujours méconnus, à savoir si celles-ci nécessitent différents effecteurs pour que cette activation ait lieu étant donné que nous ne sommes pas dans le milieu physiologique de ces protéines qui sont normalement neuronales, ne nous permettent pas de tirer des conclusions pour le moment. L'utilisation d'un anticorps phospho-thréonine afin de confirmer que la Thr161 est phosphorylée ou bien faire un essai kinase pour mesurer l'activité de l'histone-H1, un des substrats de Cdk5, sont définitivement les meilleures approches pour la suite. Par contre, un des problèmes des anticorps phospho-thréonine, contrairement à d'autres anticorps tels phospho-sérine ou phospho-tyrosine par exemple, est qu'ils sont très dépendants de l'environnement autour de la thréonine, ce qui explique que la grande majorité des études vont utiliser des anticorps maison développés spécifiquement

pour une thréonine précise d'une séquence (Xie et al., 2009). Ces raisons demanderaient donc d'investir temps et argent pour optimiser le tout, c'est pourquoi nous avons changé notre approche afin de plutôt mesurer l'impact que pouvait avoir l'absence de Cdk5 ou COPB1 sur l'expression de surface du récepteur opioïde delta.

4.4 : Impact de l'absence de Cdk5 sur le trafic du DOP

L'interaction entre Cdk5 et le DOP maintenant confirmée, il fallait vérifier quel impact Cdk5 a sur le DOP. Pour ce faire, un DsiRNA contre Cdk5 a été utilisé, qui permet une grande diminution de son expression, et avons vérifié l'effet de cette inhibition sur l'expression de surface du DOP par la méthode d'ELISA. Les constructions contrôle (pcDNA3), p35-myc seule, COPB1-myc seule et la coexpression de p35-myc et COPB1-myc ont été transfectées dans des cellules exprimant de façon stable le FlagDOP. Ces conditions ont soit été traitées avec un DsiCTRL, qui ne reconnaît aucune séquence, ou avec le DsiRNA contre Cdk5 (figure 14). Entre les conditions contrôles, aucune différence significative n'est observée, passant de 100,0% pour la condition contrôle avec pcDNA3 à un maximum de 112,4% \pm 9,5 pour la condition où p35-myc et COPB1-myc sont coexprimées (tableau 2). Une surexpression de soit l'activateur de Cdk5, p35 (103,7% \pm 2,1), ou de la sous-unité beta du complexe COPI, COPB1 (103,3% \pm 5,4), lorsque traitées avec le DsiCTRL, n'entraîne pas de changement significatif au niveau des niveaux membranaires de DOP. Malgré une légère augmentation lorsque p35 et COPB1 sont coexprimés (112,4% \pm 9,5), cette augmentation n'est pas significative. Le même bilan est observé lorsque les conditions ayant été traitées avec le DsiRNA Cdk5 sont comparées entre elles, allant de 73,6% \pm 13,5 pour la condition avec pcDNA3 jusqu'à 66,6% \pm 7,1 lorsque p35 et COPB1 sont coexprimées. Par contre, lorsque les résultats traités avec le DsiRNA Cdk5 sont comparés au DsiCTRL, une diminution statistiquement significative de l'expression de surface du DOP est observée pour chaque condition. En effet, l'inhibition de l'expression de Cdk5 par son DsiRNA diminue grandement l'expression du DOP, supportant une fois de plus un rôle pour Cdk5 dans le trafic du DOP. Un DsiRNA contre COPB1 a aussi été testé avec les mêmes conditions. Les résultats étaient surprenants puisqu'une diminution de l'expression de surface a été observée dans toutes les conditions, passant à 46,8% \pm 12,6 pour la condition avec pcDNA3 à 41,9% \pm 11,6 lorsque seule p35 est surexprimée (tableau 2). Ces résultats ne concordaient pas du tout avec

une étude publiée par notre laboratoire où l'utilisation d'un DsiRNA contre la sous-unité COPB1 du complexe COPI, qui rappelons-le est responsable du transport rétrograde entre le Golgi et le réticulum endoplasmique, dans des essais d'expression de surface par ELISA montrait une hausse significative de l'expression de surface du DOP en absence de COPB1 (St-Louis et al., 2017). Un effet similaire était donc attendu dans notre cas, puisque le récepteur DOP ne serait plus retenu à l'intérieur de la cellule par COPI et DOP pourrait donc migrer vers la surface de la cellule. Par contre, le DsiRNA COPB1 avait des effets très cytotoxiques sur nos cellules HEK293 stables pour FlagDOP. La forme de celles-ci étaient très rondes et le traitement avec le DsiRNA COPB1 rendait très difficile l'adhésion des cellules au fond des puits et le peu qui parvenait à y adhérer était très sensible lors des lavages et se décollait parfois. Ces observations n'ont jamais été vues dans le cas des DsiRNA CTRL et Cdk5 utilisés. Par contre, une étude du groupe du Pre Sztul a montré qu'une déplétion de COPB1 causait la colocalisation de marqueurs des compartiments intracellulaires tels le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les endosomes tardifs dans un même compartiment (Styers et al., 2008). L'utilisation d'un DsiRNA COPB1 pourrait donc avoir un impact important sur le routage intracellulaire.

Dans le cas des résultats avec les DsiCTRL et Cdk5, s'ils sont comparés à ceux obtenus par immunoprécipitation, certaines différences notoires sont observées. Tout d'abord, dans nos essais d'expression de surface du DOP, la Cdk5 n'est pas surexprimée, donc l'effet observé est causé par les niveaux endogènes de Cdk5 qui sont affectés par le DsiRNA Cdk5. Nous n'avons donc pas reproduit le résultat intrigant qu'est la perte d'interaction de Cdk5 et p35 avec le DOP lorsqu'elles sont coexprimées (figure 7). L'hypothèse derrière ce résultat consiste dans la phosphorylation du DOP, ce qui fait dissocier le complexe Cdk5/p35 du DOP, d'où la perte de l'interaction. Malgré que la phosphorylation du récepteur n'ait pu être confirmée dans ces travaux, reproduire la perte d'interaction dans l'expérience d'expression de surface permettrait de supporter notre hypothèse si une augmentation des niveaux membranaires du DOP est observée. Il serait intéressant d'évaluer si une surexpression ou une réexpression de Cdk5 ramène les niveaux de DOP comparable au DsiCTRL, ainsi l'effet observé serait confirmé, soit la baisse d'expression de surface du DOP, est bel et bien causé par la déplétion de Cdk5 par son

DsiRNA. Une autre différence entre les résultats d'immunoprécipitation et d'expression de surface est au niveau de l'interaction de COPB1 avec le DOP. Dans la figure 12, il est montré qu'une surexpression de p35 et COPB1 dans des cellules HEK293 stables pour le FlagDOP diminuait l'interaction de COPB1 avec le DOP. Dans le cas des essais d'expression de surface du DOP, autant avec le DsiCTRL que le DsiRNA Cdk5, aucune différence significative n'est observée entre la condition où p35 et COPB1 sont surexprimées et les autres (p35 ou COPB1 seules) (figure 14). Il serait intéressant de vérifier les niveaux d'expression totale du DOP dans les différentes conditions testées lors des essais d'expression de surface afin de voir si les DsiRNA CTRL et Cdk5 altère l'expression du récepteur DOP. Lors de la validation de ces outils, nous n'avons pas observé d'effets sur l'expression du FlagDOP dans les cellules HEK293 stables pour celui-ci (figure 13B).

En résumé, il était attendu d'observer une hausse de l'expression de surface du DOP lorsque Cdk5 est en présence de son activateur p35 puisque, selon notre hypothèse, cette interaction rendrait la Cdk5 active et engendrerait la phosphorylation du DOP, bloquant l'accès du complexe COPI au site de liaison sur l'ICL2 du DOP. Nous avons plutôt observé aucun effet significatif entre les différentes conditions traitées avec le DsiCTRL. Par contre, une déplétion de l'expression de la Cdk5 par un DsiRNA Cdk5 a montré une baisse significative de l'expression de surface du DOP. Ces résultats avec les cellules traitées avec le DsiCTRL et DsiRNA Cdk5 viennent supporter le fait que l'activation de Cdk5 ne semble pas suffisante pour augmenter les niveaux de DOP à la membrane, mais que l'absence de Cdk5 à elle seule vient impacter de façon significative l'expression du récepteur opioïde delta à la membrane cellulaire et ce indépendamment de son activation par p35 ou de la surexpression de COPB1. De plus, nous nous attendions à une hausse de l'expression de surface avec l'utilisation du DsiRNA contre COPB1 (tableau 2), mais dû à la cytotoxicité observée, nous n'avons pu obtenir ce qui était attendu et rapporté par la littérature, soit une augmentation de près de 80% de l'expression de surface du DOP ($179,5\% \pm 24$) avec un DsiRNA COPB1 comparé à un DsiCTRL (100%) (St-Louis et al., 2017). Afin de mieux évaluer l'impact de Cdk5 sur l'interaction entre COPI et DOP, il serait intéressant d'étudier le récepteur phosphorylé comparé au type sauvage et ainsi observer si cela modifie l'interaction de COPI.

4.5 : Autres approches pour la caractérisation du site d'interaction de Cdk5

Différentes approches ont été utilisées afin de mieux caractériser comment Cdk5 interagit avec le DOP. Tout d'abord, un mutant dominant négatif de Cdk5 (Cdk5-D145N-HA, Addgene plasmide #1873) qui a pour but de faire compétition avec la Cdk5 pour l'interaction avec le récepteur DOP a été utilisé. Cet effet serait donc délétère au niveau de l'interaction Cdk5/DOP puisque le mutant dominant négatif de la Cdk5, même s'il peut possiblement interagir avec p35, ne devrait pas posséder d'activité kinase et donc le DOP ne pourra être phosphorylé. Des immunoprécipitations du FlagDOP en présence du mutant dominant négatif et de p35 ont été faites,

mais un problème dans l'expression du mutant Cdk5-DN-HA ne permettait pas de conclure de façon juste les résultats obtenus. L'avantage d'utiliser ce type de mutant comme alternative à l'utilisation d'un DsiRNA est principalement le fait que rien n'est inhibé, ce qui ne débalance pas les différents mécanismes de la cellule. Un DsiRNA va dépléter la protéine qu'il cible et si celle-ci est

impliquée dans plusieurs mécanismes importants, il devient difficile d'attribuer les effets observés à la déplétion de cette protéine. Dans le cas de Cdk5, ses rôles se retrouvent principalement au niveau neuronal, donc sa déplétion dans des cellules rénales telles les HEK293 ne devrait pas interférer ses mécanismes. Une autre approche afin d'identifier le site d'interaction de Cdk5 fut la synthèse de peptides mimétiques de la troisième boucle intracellulaire du DOP. L'avantage de ces peptides est d'identifier précisément le site d'interaction de Cdk5 sur la troisième boucle intracellulaire du DOP. Afin de couvrir la longueur complète de la boucle et pour que les peptides demeurent assez solubles, la boucle a été séparée en trois parties : la première couvrant la première moitié, un deuxième couvrant la deuxième moitié et la troisième chevauchant les deux premières parties au centre (figure

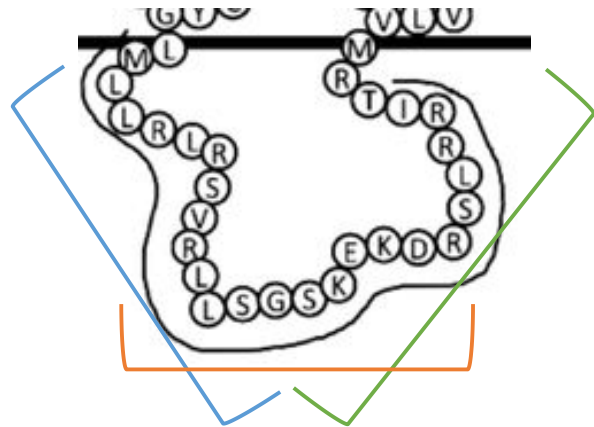


Figure 16 : Schématisation de la séquence en acides aminés de la troisième boucle intracellulaire du DOP. Les crochets représentent grossièrement chacun des peptides

16 ; séquence dans le tableau 1). Ces peptides permettront de compétitionner avec la séquence correspondante sur la boucle complète pour l'interaction de Cdk5. Ainsi, il sera plus simple d'identifier dans quelle partie de la troisième boucle intracellulaire la Cdk5 semble se lier. Un gel de Coomassie a été fait avec nos différents domaines du DOP fusionnés GST et une courbe BSA afin de vérifier qu'ils étaient encore suffisamment exprimés et d'obtenir une quantité en µg de protéines plus précise pour ceux-ci considérant que nous voulions utiliser les peptides mimétiques 10 fois plus concentrés pour s'assurer qu'il y ait compétition. Par la suite, une fois que la portion de la boucle où Cdk5 se lie sera identifiée, des mutations de 1 à 3 acides aminés en alanine de cette portion seront effectuées et vérifierons si Cdk5 lie encore par essai de pull-down après ces mutations, ce qui permettra de comprendre davantage le motif possible reconnu par ce partenaire. Cela demeure une expérience pivot pour la suite du projet puisque, rappelons-le, le site d'interaction de Cdk5 demeure encore inconnu à ce jour. Une autre approche utilisée était l'utilisation de roscovitine, un inhibiteur sélectif des Cdks (Cdk1, Cdk2, Cdk5, Cdk7 et Cdk9). Le but était encore une fois une alternative aux DsiRNAs, c'est-à-dire d'inhiber la Cdk5 afin d'avoir une meilleure idée de son impact sur le trafic du DOP. Nous avons essayé des expériences exploratoires avec cet inhibiteur à des concentrations de 2 et 20 µM pendant 24 heures sur des cellules HEK293 afin de voir si la co-immunoprécipitation des différentes protéines telles p35, Cdk5 et COPB1, seules ou coexprimées, avec le DOP était modifiée (résultats non montrés). La roscovitine avait déjà été utilisée au sein de notre laboratoire dans le passé où un traitement chronique à la roscovitine réduisait les effets antinociceptifs et antihyperalgésiques de la deltorphine II, un agoniste sélectif du DOP, chez des rats traités à la morphine chronique ou avec l'adjuvant complet de Freund (CFA) (Beaudry et al., 2015). Puisque la roscovitine est un inhibiteur non-sélectif des Cdks, ils ont confirmé que l'effet était bel et bien causé par l'inhibition de Cdk5 en utilisant un peptide mimétique de la deuxième boucle intracellulaire du DOP (C11-DOPICL2), soit où se retrouve la séquence de phosphorylation de Cdk5. En présence de ce peptide, une diminution de l'analgésie induite par la deltorphine II a été observée (Beaudry et al., 2015). L'utilisation de la roscovitine serait donc une alternative intéressante aux DsiRNAs et aux peptides mimétiques pour étudier l'impact qu'a Cdk5 sur le trafic du DOP et identifier précisément son site d'interaction.

4.6 : Interaction entre GASP-1 et le DOP

Différents partenaires interagissant avec le DOP ont été montrés dans la littérature. Le groupe de Heydorn *et al* ont montré grâce à un système à double hybride que les protéines GASP-1, SNX1, NSF et NHERF-1 interagissaient avec la queue C-terminale du récepteur opioïde delta (Heydorn et al., 2004). Notre hypothèse était qu'en condition non-stimulée, le DOP serait pris en charge par les protéines GASP-1 et SNX1 pour être dirigés vers les lysosomes afin d'être dégradé. En condition d'inflammation par du CFA ou de traitement à la morphine chronique, ce serait plutôt NSF et NHERF-1 qui prendraient en charge le DOP pour permettre son recyclage vers la membrane. Des essais d'immunoprécipitation du FlagDOP transfecté dans des cellules HEK293 modifiées pour être plus adhérentes (AD293) ont été faites avec ces 4 différentes protéines transfectées à l'aide de l'agent X-tremeGENE HP. Seule l'interaction entre FlagDOP et GASP-1 mCherry a été observé par co-immunoprécipitation (figure 15). Les RCPGs, lorsque stimulés par leur ligand, sont normalement internalisés dans des endosomes précoces où ils seront soit recyclés à la membrane ou dirigés vers les lysosomes pour leur dégradation. Dans le cas de GASP-1, elle serait impliquée dans le triage de plusieurs RCPGs par la machinerie ESCRT avec entre autres sa composante HRS et la protéine *dysbindin*. GASP-1 serait impliquée dans la dégradation du récepteur DOP via son triage vers les corps multivésiculaires (*multivesicular bodies* ; MVB) puis vers les lysosomes grâce à sa liaison avec HRS de la machinerie ESCRT par *dysbindin*. Selon la littérature, la machinerie qu'est GASP retiendrait le DOP au niveau de la membrane limitante des endosomes, ce qui retarderait leur entrée vers la voie de recyclage pour ultimement être dirigé vers les lysosomes pour sa dégradation (Whistler et al., 2002 ; Hislop and von Zastrow, 2011). Cela fait de GASP-1 un partenaire important dans le triage endosomal. De plus, l'interaction entre DOP et GASP-1 a été testée dans différents tissus, soit les DRGs de rats ainsi que le cerveau et moelle de souris, mais aucune interaction n'a pu être détectée dû aux anticorps contre GASP-1 qui ne détectaient pas les protéines endogènes. Il serait intéressant pour la suite de vérifier notre hypothèse à savoir s'il y a un équilibre entre ces 4 protéines selon les conditions auxquelles les cellules ou les animaux sont soumises. Par exemple, il serait intéressant d'obtenir un anticorps efficace afin de détecter ces 4 protéines de façon endogène dans les tissus animaux. Les animaux pourraient alors être traités à la morphine pour 48h ou au CFA pour 72h et les niveaux d'association de

ces protéines avec le DOP pourraient être mesurés par immunoprécipitation du DOP en utilisant les souris *knock-in* pour le FlagDOP disponible au laboratoire. Par la suite, identifier le domaine intracellulaire précis où ces protéines interagissent sur le DOP ainsi que vérifier leur importance dans le triage du DOP avec l'utilisation de DsiRNA permettraient de mieux caractériser quels rôles ont ces protéines dans le triage endosomal du DOP. La compréhension des mécanismes entourant le trafic du DOP vers la membrane plasmique doit passer par plusieurs partenaires différents. Des outils permettant la détection de ces protéines endogènes seront nécessaires pour le futur afin de répondre à tous les objectifs de ce projet. Bien que ce soit mieux connu pour certaines, ces 4 protéines jouent un rôle dans la régulation du DOP et pourraient être des cibles intéressantes dans la recherche de nouvelles cibles pharmacologiques dans le traitement de la douleur.

5. Conclusion et perspectives

La localisation unique du récepteur opioïde delta et son potentiel analgésique prometteur en font une cible de choix dans le développement de nouveaux médicaments dans le traitement de la douleur. Au cours de mes recherches, j'ai pu étudier divers partenaires potentiellement impliqués dans le trafic des récepteurs DOP vers la surface de la cellule, les rendant ainsi disponibles pour la liaison de leurs ligands. Tout d'abord, j'ai travaillé sur des projets connexes telles les interactions de GASP-1, SNX1, NSF et NHERF-1 ainsi que la protéine alternative AltDOP2. Nous avons pu confirmer l'interaction de GASP-1 avec le DOP au niveau cellulaire, mais n'avons pu faire semblable au niveau *in vivo* puisque nos anticorps ne détectaient pas la protéine endogène. Malgré que nous n'ayons pas réussi à détecter les interactions avec les autres partenaires, je crois tout de même qu'il ne faut pas les écarter. GASP-1 et SNX1 sont tous deux impliqués dans la voie de dégradation des récepteurs tandis que NSF et NHERF-1 sont plutôt dans la voie du recyclage. Nous avons surtout étudié les interactions sur un récepteur non stimulé, ce qui pourrait en partie expliquer les difficultés rencontrées au cours du projet, considérant que ces interactions pourraient nécessiter la liaison d'un ligand pour interagir. En effet, un traitement prolongé à la morphine ainsi qu'en condition inflammatoire avec l'injection de CFA ont été rapportés pour augmenter les niveaux de DOP exprimés à la membrane. Il serait donc intéressant d'analyser ces interactions de DOP avec ces partenaires (GASP-1, SNX1, NSF et NHERF-1) dans ces conditions afin de mieux les caractériser.

Les interactions montrées dans ces travaux entre Cdk5/p35 avec le récepteur opioïde delta ainsi que la formation d'un potentiel complexe entre Cdk5/p35 étaient très peu voire pas documentées dans la littérature. L'impact de Cdk5 sur l'expression du DOP à la surface a aussi été montré via l'utilisation de DsiRNA. Par contre, nous n'avons pu montrer un effet concret de Cdk5 ou de sa phosphorylation sur le DOP n'a pu être montré. Si nous avions identifié un effet direct de l'absence de Cdk5 sur le DOP ou bien si nous avions pu montrer que la phosphorylation du DOP par la Cdk5 activée bloquait bel et bien la liaison de COPI sur la deuxième boucle intracellulaire. Je crois que les découvertes que nous avons faites permettent définitivement d'éclaircir le futur des recherches sur le récepteur opioïde delta en caractérisant davantage une cible prometteuse qu'est la Cdk5. Plusieurs questions demeurent

encore à être étudiées. Par exemple, nous devons encore prouver que la phosphorylation du DOP par Cdk5 bloque la liaison de COPI à ce site. Nous avons donc besoin de montrer que le DOP est en effet phosphorylé suite à l'activation de Cdk5 par p35, ce qui confirmerait aussi que Cdk5 est bel et bien activée. Ensuite, il serait majeur de montrer que cette phosphorylation bloque la liaison de COPI à son site sur l'ICL2 du DOP ou du moins diminue celle-ci considérant qu'on retrouve 13 sites de liaison potentiels de COPI sur le DOP et que ceux-ci pourraient compenser si l'un d'eux est bloqué. Une autre hypothèse quant au blocage de la liaison de COPI serait qu'il y aurait formation d'un lien entre la charge négative du groupement phosphate, suivant la phosphorylation du DOP par Cdk5, et la charge positive de la Lys164. Ceci renforcerait aussi le fait que le tout est un processus très dynamique et qu'une fois le DOP phosphorylé, Cdk5/p35 se détache, expliquant en partie le pourquoi nous perdons l'interaction lorsque ce complexe est coexprimé. Parmi les autres défis majeurs que nous sommes confrontés dans ce projet, il y a aussi l'identification du site d'interaction de Cdk5 sur le DOP qui demeure méconnu. Nous avons établi plusieurs pistes motivantes qui aident grandement à répondre à cette question, ce qui en ferait une grande découverte et évidemment placerait Cdk5 dans les meilleures cibles pour le développement de nouveaux traitements contre la douleur. Un autre point important que nous n'avons pu aborder durant mes travaux est le lien entre Cdk5 et la morphine. En effet, un traitement à la morphine chez des rats a montré une augmentation de l'activité kinase de la Cdk5 et de la phosphorylation du DOP, via une augmentation des niveaux de protéines de p35, l'activateur spécifique neuronal de Cdk5 (Xie et al., 2009). De plus, ce même groupe a montré que la phosphorylation de la Thr161 du DOP par Cdk5 est requise pour la tolérance anti-nociceptive à la morphine *in vivo*. Le lien entre Cdk5 et la morphine ouvre plusieurs portes quant au chemin à emprunter pour la suite du projet. Puisque très peu d'expériences ont été effectuées sur les rongeurs dans mon projet, je crois que nous avons suffisamment confirmé le modèle et les différentes interactions *in vitro* pour pouvoir tester davantage le tout chez des animaux traités à la morphine ou en condition d'inflammation. L'idée serait tout d'abord de mettre au point l'essai d'activité kinase *in vitro* puis de l'adapter *in vivo*. Il faut pouvoir confirmer que la Cdk5 est activée et que le DOP est phosphorylé. Un point intéressant pourrait aussi être les niveaux de protéines de p35. En effet, p35 pourrait être une cible potentielle puisque ses niveaux protéiques augmentent lors d'un traitement à la morphine, ce qui cause une

augmentation de la phosphorylation du DOP par Cdk5 (Xie et al., 2009). Que ce soit en ciblant Cdk5 ou p35, le futur est prometteur pour le développement d'une alternative moins dangereuse que les opioïdes présentement utilisés. Le développement d'un composé qui modulerait l'activité kinase de Cdk5, soit en mimant p35 ou en augmentant sa production, permettrait au DOP d'être davantage phosphorylé et d'augmenter son export vers la membrane plasmique. Il reste plusieurs expériences à faire avant de confirmer si Cdk5 et p35 peuvent être des cibles pharmacologiques potentielles dans le développement d'un traitement efficace contre la douleur. Il faudrait vérifier si, en jouant sur les quantités de p35, l'activation de Cdk5 et la phosphorylation du DOP est suffisante pour augmenter les niveaux à la membrane du DOP, contrairement à ce qui a été observé dans nos essais d'expression de surface avec le DsiCTRL. En modulant les quantités de p35 et en mesurant l'activité kinase de la Cdk5, nous pourrions vérifier cette hypothèse, sinon je crois que Cdk5 et p35 seraient plus efficaces s'ils étaient utilisés en co-thérapie, c'est-à-dire avec l'administration d'un autre médicament connu, où la phosphorylation par Cdk5 empêcherait la rétention du DOP intracellulaire. Le temps presse avec la popularité grandissante de l'utilisation des opioïdes comme drogues de rue, causant la crise que l'on connaît malheureusement ces dernières années mondialement. Que ce soit en co-thérapie avec des drogues déjà bien connues afin d'éliminer le plus d'effets secondaires associés à ces drogues, la possibilité de cibler des partenaires qui permettraient d'augmenter la biodisponibilité des récepteurs opioïdes delta et d'ainsi augmenter le potentiel analgésique de ses agonistes tout en promouvant le développement de nouveaux peptides montrant peu ou aucun effet secondaire serait un énorme pas pour l'homme et une victoire pour la science.

6. Annexes

Anticorps	Compagnie	Catalog #	Mono/Poly	Espèce	Dilution
HA-Hrp (3F10)	Roche	12013819001	Mono	Rat	1/3000
HA.11	Covance	PRB-101P	Poly		1/1000
HA mono	Covance	MMS-101P	Mono		1/1000-3000
Myc-Hrp	abcam	Ab1261			1/6000
Myc mono	Cell Signaling	2276	Mono		1/1000-3000
GST-Hrp	Bethyl Lab inc.	A190-122P			1/50 000
mCherry	Neuromics	M022140	Mono	Souris	1/2000
Actin	Sigma Aldrich	A3853	Mono	Souris	1/1000
FlagM2	Sigma Aldrich	F1804	Mono	Souris	1/300-2000
Flag poly	Invitrogen	PA1-984B	Poly	Lapin	1/300-1000
Flag poly	Sigma Aldrich	F7425	Poly	Lapin	1/300-1000
Mouse-Hrp	GE Healthcare	NA934V		Souris	1/5000
Rabbit-Hrp	GE Healthcare	NA931V		Lapin	1/5000
Alcaline phosphatase	Sigma Aldrich	A3687	Poly	Lapin	1/10 000
Alexa 488	Invitrogen	A11029		Souris	1/1000
Alexa 488	Invitrogen	A21206		Lapin	1/1000
Alexa 594	Invitrogen	A11005		Souris	1/1000
Alexa 594	Invitrogen	A21207		Lapin	1/1000

Tableau 4 : Liste d'anticorps utilisés au cours de ma maîtrise. Allant de leur provenance à leur intervalle de dilution utilisé au cours des essais d'immunobuvardage, d'immunoprécipitation, d'expression de surface par ELISA et immunofluorescence. Tous les anticorps fonctionnent dans une solution de TBS-T avec du lait en poudre 5% et la majorité fonctionne dans une solution de TBS-T BSA 3%.

7. Liste des références

- Abu-Helo, A. and Simonin, F. (2010) Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated proteins (GASPs). *Pharmacology & Therapeutics* 126 (2010) 244-250.
- Al-Hasani, R. and Bruchas, M. (2011) Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 2011 December ; 115(6): 1363-1381.
- Amin, N. D., Albers, W. and Pant, H. C. (2002) Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activation requires interaction with three domains of p35. *Journal of Neuroscience Research* 67:354-362 (2002).
- Bader, S., Jaroslowski, K., Blum, H.E. and Becker, G. (2011) Opioid-induced constipation in advanced illness: safety and efficacy of methylnaltrexone bromide. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 2011:5 201-211.
- Basbaum, A.I., Bautista, D. M., Scherrer, G. and Julius, D. (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009 Oct 16;139(2):267-84.
- Beaudette, K. N., Lew, J. and Wang, J. H. (1993) Substrate specificity characterization of a cdc2-like protein kinase purified from bovine brain. *The Journal of Biological Chemistry: Vol. 268, No. 28, Issue of October 5, pp. 20825-20830, 1993.*
- Beaudry, H., Mercier-Blais, A-A., Delaygue, C., Lavoie, C., Parent, J-L., Neugebauer, W. and Gendron, L. (2015) Regulation of μ and δ opioid receptor functions: involvement of cyclin-dependent kinase 5. *British Journal of Pharmacology* (2015) 172 2573-2587.
- Beswick, A. and Piccininni, C. (2018) The cost of pain: Economic implications of pain management practices. *UWOMJ* <https://ojs.lib.uwo.ca/index.php/uwomj/article/view/1925> 2018 April 24(Accessed August 2019);87(1):71-2.
- Bie, B. and Pan, Z. Z. (2007) Trafficking of central opioid receptors and descending pain inhibition. *Mol Pain*. 2007 Dec 4;3:37.
- Bie, B., Zhang, Z., Cai, Y-Q., Zhu, W., Zhang, Y., Dai, J., Lowenstein, C. J., Weinman, E. J. and Pan, Z. Z. (2010) Nerve growth factor-regulated emergence of functional δ -opioid receptors. *The Journal of Neuroscience*, April 21, 2010 – 30(16):5617-5628.
- Bornert, O., Möller, T. C., Boeuf, J., Candusso, M-P., Wagner, R., Martinez, K. L. and Simonin, F. (2013) Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating

- interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors. *PLoS One*, 2013;8(2):e56336.
- Brandizzi, F. and Barlowe, C. (2013) Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 382-392(2013).
- Brismar, H., Asghar, M., Carey, R. M., Greengard, P. and Aperia, A. (1998) Dopamine-induced recruitment of dopamine D1 receptors to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998). Vol. 95, pp. 5573-5578.
- Bruchas, M. R. and Chavkin, C. (2010) Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010 June ; 210(2): 137-147..
- Cahill, C. M., Morinville, A., Lee, M-C., Vincent, J-P., Collier, B. and Beaudet, A. (2001) Prolonged morphine treatment targets δ opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances δ -mediated antinociception. *The Journal of Neuroscience*, October 1, 2001, 21(19):7598-7607.
- Cahill, C. M., Morinville, A., Hoffert, C., O'Donnell, D. and Beaudet, A. (2003) Up-regulation and trafficking of δ opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain* 101 (2003) 199-208.
- Cahill, C. M., Holdridge, S. V. and Morinville, A. (2007) Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol.28 No. 1, 2007 Jan;28(1):23-31.
- Canadian Pain Society. (2010) DRAFT Canadian Pain Strategy – July 2010. www.canadianpaincoalition.ca/media/national_pain_strategy.pdf (Consulté en Août 2019).
- Charbogne, P., Kieffer, B. L. and Befort, K. (2014) 15 years of genetic approaches *in vivo* for addiction research: opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology*. 2014 January ; 76(0 0):204-217.
- Chen, H-J., Xie, W-Y., Hu, F., Zhang, Y., Wang, J. and Wang, Y. (2012) Disruption of δ -opioid receptor phosphorylation at Threonine 161 attenuates morphine tolerance in rats with CFA-induced inflammatory hypersensitivity. *Neurosci Bull April 1, 2012*, 28(2):182-192.
- Cheng, P. Y., Wu, D., Soong, Y., McCabe, S., Albert Decena, J. and Szeto, H. H. (1993) Role of μ_1 - and δ -opioid receptors in modulation of fetal EEG and respiratory activity.

- Am J Physiol.* 1993 Aug;265(2 Pt 2):R433-8.
- Chun, L., Zhang, W-H. and Liu, J-F. (2012) Structure and ligand recognition of class C GPCRs. *Acta Pharmacologica Sinica* 33, 312-323(2012).
- Codd, E. E., Carson, J. R., Colburn, R. W., Stone, D. J., Van Besien, C. R., Zhang, S-P., Wade, P. R., Gallantine, E. L., Meert, T. F., Molino, L., Pullan, S., Razler, C. M., Dax, S. L. and Flores, C. M. (2009) JNJ-20788560 [9-(8-Azabicyclo[3.2.1]oct-3-ylidene)-9Hxanthene-3-carboxylic Acid Diethylamide], a Selective Delta Opioid Receptor Agonist, Is a Potent and Efficacious Antihyperalgesic Agent That Does Not Produce Respiratory Depression, Pharmacologic Tolerance, or Physical Dependence. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 Apr;329(1):241-51..
- Cowan, A., Zhu, X. Z., Mosberg, H. I., Omnaas, J. R. and Porreca, F. (1988) Direct Dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1988 Sep;246(3):950-5.
- Cragg, J. J., Warner, F. M., Shupler, M. S., Jutzeler, C. R., Cashman, N., Whitehurst, D. G. T. and Kramer, J. K. (2018) Prevalence of chronic pain among individuals with neurological conditions. *Statistics Canada, Catalogue no. 82-003-X – Health Reports, Vol. 29, no. 3, pp. 11-16, March 2018.*
- Danielsson, I., Gasior, M., Stevenson, G. W., Folk, J. E., Rice, K. C. and Stevens Negus, S. (2006) Electroencephalographic and convulsant effects of the delta opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006 October ; 85(2):428-434.
- Dores, M. R. and Trejo, J. (2014) Atypical regulation of G protein-coupled receptor intracellular trafficking by ubiquitination. *Curr Opin Cell Biol.* 2014 April ; 27: 44-50..
- Drake, M. T., Shenoy, S. K. and Lefkowitz, R. J. (2006) Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res.* 2006;99:570-582.
- Dubois, D. and Gendron, L. (2010) Delta opioid receptor-mediated analgesia is not altered in preprotachykinin A knockout mice. *European Journal of Neuroscience, Vol. 32, pp. 1921-1929, 2010.*
- Evans, C. J., Keith Jr, D. E., Morrison, H., Magendzo, K. and Edwards, R. H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science, New Series, Vol. 258, No. 5090 (Dec. 18, 1992), pp. 1952-1955.*
- Feng, P., Rahim, R. T., Cowan, A., Liu-Chen, L-Y., Peng, X., Gaughan, J., Meissler Jr, J. J.,

- Adler, M. W. and Eisenstein, T. K. (2006) Effects of mu, kappa or delta opioids administered by pellet or pump on oral *Salmonella* infection and gastrointestinal transit. *European Journal of Pharmacology* 534 (2006) 250-257.
- Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H. W., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde, O., Maldonado, R. and Kieffer, B. L. (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):195-200.
- Fraser, G. L., Gaudreau, G-A., Clarke, P. B. S., Ménard, D. P. and Perkins, M. N. (2000) Antihyperalgesic effects of δ opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *British Journal of Pharmacology* (2000) 129, 1668-1672.
- Furst, J., Sutton, R. B., Chen, J., Brunger, A. T. and Grigorieff, N. (2003) Electron cryomicroscopy structure of N-ethyl maleimide sensitive factor at 11 Å resolution. *The EMBO Journal Vol. 22 No. 17 pp. 4365-4374, 2003.*
- Gallantine, E. L. and Meert, T. F. (2005) A comparison of the antinociceptive and adverse effects of the μ -opioid agonist morphine and the δ -opioid agonist SNC80. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2005, 97, 39-51.
- Gendron, L., Lucido, A. L., Mennicken, F., O'Donnell, D., Vincent, J-P., Stroh, T. and Beaudet, A. (2006) Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic δ -opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *The Journal of Neuroscience, January 18, 2006 – 26(3);953-962.*
- Gendron, L., Pintar, J. E. and Chavkin, C. (2007) Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience* 150 (2007) 807-817.
- Gendron, L., Esdaile, M. J., Mennicken, F., Pan, H., O'Donnell, D., Vincent, J-P., Devi, L. A., Cahill, C. M., Stroh, T. and Beaudet, A. (2007) Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin. *Neuroscience* 144 (2007) 263-274.
- Gendron, L., Mittal, N., Beaudry, H. and Walwyn, W. (2015) Recent advances on the δ opioid receptor: from trafficking to function. *British Journal of Pharmacology* (2015) 172 403-419.
- Gullapalli, A., Wolfe, B. L., Griffin, C. T., Magnuson, T. and Trejo, J. (2006) An essential

- role for SNX1 in lysosomal sorting of protease-activated receptor-1: evidence for retromer-Hrs-, and Tsg101-independent functions of sorting nexins. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 17, 1228-1238, March 2006.
- Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C-W., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., Stoffel, R. H., Barak, L. S., Shenolikar, S., Weinman, E. J., Grinstein, S. and Lefkowitz, R. J. (1998a) The β_2 -adrenergic receptor interacts with the Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor to control Na^+/H^+ exchange. *Nature* Vol. 392, 9 April 1998.
- Hall, R. A., Ostedgaard, L. S., Premont, R. T., Blitzer, J. T., Rahman, N., Welsh, M. J. and Lefkowitz, R. J. (1998b) A C-terminal motif found in the β_2 -adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998). Vol. 95, pp. 8496-8501, July 1998.
- Harmar, A. J. (2001) Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biology* 2001, 2(12):reviews3013.1-3013.10.
- Heydorn, A., Søndergaard, B. P., Ersbøll, B., Holst, B., Nielsen, F. C., Haft, C. R., Whistler, J. and Schwartz, T. W. (2004) A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J Biol Chem* 2004 Dec 24;279(52):54291-303.
- Hislop, J. N., Marley, A. and von Zastrow, M. (2004) Role of mammalian vacuolar protein-sorting proteins in endocytic trafficking of a non-ubiquitinated G protein-coupled receptor to lysosomes. *J Biol Chem* 2004 May 21;279(21):22522-31.
- Hislop, J. N. and von Zastrow, M. (2011) Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. *Traffic*. 2011 Feb; 12(2): 137-148.
- Holden, J. E., Jeong, Y. and Forrest J. M. (2005) The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Clin Issues*. 2005 Jul-Sep;16(3):291-301.
- Hu, G. M., Mai, T. L. and Chen, C. M. (2017) Visualizing the GPCR network: Classification and Evolution. *Sci Rep* 2017 Nov 14;7(1):15495.
- Huang, P., Steplock, D., Weinman, E. J., Hall, R. A., Ding, Z., Li, J., Wang, Y. and Liu-Chen, L. Y. (2004) Kappa opioid receptor interacts with Na^+/H^+ -exchanger regulatory

- factor-1/Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50 (NHERF-1/EBP50) to stimulate Na^+/H^+ -exchange independent of G(i)/G(o) proteins. *J Biol Chem* 2004 Jun 11;279(24):25002-9.
- Jackson, L. P. (2014) Structure and mechanism of COPI vesicle biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 2014, 29:67-73.
- Jensen, T. S. and Finnerup, N. B. (2014) Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol.* 2014 Sep;13(9):924-35.
- Jeong, J., Park, Y. U., Kim, D. K., Lee, S., Kwak, Y., Lee, S. A., Suh, Y. H., Gho, Y. S., Hwang, D. and Park, S. K. (2013) Cdk5 phosphorylates dopamine D2 receptor and attenuates downstream signaling. *PLoS One* 2013 Dec 31;8(12):e84482.
- Kest, B., Sarton, E. and Dahan, A. (2000) Gender differences in opioid-mediated analgesia. *Anesthesiology* 2000; 93:539-47.
- Khattar, V. and Thottassery, J. V. (2013) Cks1: structure, emerging roles and implications in multiple cancers. *J Cancer Ther.* 2013 Oct 1; 4(8): 1341-1354.
- Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C. and Hirth, C. (1992) The δ -opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 89, pp. 12048-12052.
- Kieffer, B. L. and Gavériaux-Ruff, C. (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology* 66 (2002) 285-306.
- Kurten, R. C., Cadena, D. L. and Gill, G. N. (1996) Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science, New Series, Vol. 272, No. 5264 (May 17, 1996), pp. 1008-1010.*
- Lagerström, M. C. and Schiöth, H. B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 7,339-357(2008).
- Law, P-Y., Wong, Y. H. and Loh, H. H. (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000. 40:389-430.
- Lee, M-H., Nikolic, M., Baptista, C. A., Lai, E., Tsai, L-H. and Massagué, J. (1996) The brain-specific activator p35 allows Cdk5 to escape inhibition by p27(Kip1) in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) Vol. 93, pp. 3259-3263, April 1996.
- Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M. and Tsai, L. H. (2000)

- Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*. 2000 May 18;405(6784):360-4.
- Lefkowitz, R. J. (2004) Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Aug;25(8):413-22.
- Lew, J., Huang, Q-Q., Qi, Z., Winkfein, R. J., Aebersold, R., Hunt, T. and Wang, J. H. (1994) A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*. 1994 Sep 29;371(6496):423-6.
- Li, J-G., Chen, C. and Liu-Chen, L-Y. (2002) Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50/ Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor (EBP50/NHERF) blocks U50,488H-induced down-regulation of the human κ opioid receptor by enhancing its recycling rate. *J Biol Chem*, 2002 Jul 26;277(30):27545-52.
- Li, J-G., Chen, C., Huand, P., Wang, Y. and Liu-Chen, L. Y. (2012) 14-3-3 ζ Protein regulates anterograde transport of the human κ -opioid receptor (hKOPR). *J Biol Chem*. 2012 Nov 2;287(45):37778-92.
- Liu, C., Zhai, X., Zhao, B., Wang, Y. and Xu, Z. (2017) Cyclin I-like (CCNI2) is a cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator and is involved in cell cycle regulation. *Sci Rep*. 2017 Jan 23;7:40979.
- Lord, J. A. H., Waterfield, A. A., Hughes, J. and Kosterlitz, H. W. (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature Vol.* 267 9 June 1977.
- Lu, Q., Hope, L. W., Brasch, M., Reinhard, C. and Cohen, S. N. (2003) TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Jun 24; 100(13): 7626-7631.
- Lucido, A. L., Morinville, A., Gendron, L., Stroh, T. and Beaudet, A. (2005) Prolonged morphine treatment selectively increases membrane recruitment of delta-opioid receptors in mouse basal ganglia. *J Mol Neurosci*. 2005;25(3):207-14.
- Lynch, M. E. (2011) The need for a Canadian pain strategy. *Pain Research & Management: The Journal of the Canadian Pain Society*, 16(2), 77.
- Ma, W. and Goldberg, J. (2013) Rules for the recognition of dilysine retrieval motifs by coatamer. *The EMBO Journal* (2013) 32, 926-937.
- Marchese, A., Chen, C., Kim, Y-M. and Benovic, J. L. (2003) The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *TRENDS in Biochemical Sciences*, Vol 28 No.7 July 2003,

369-376.

- Marley, A. and von Zastrow, M. (2010) Dysbindin Promotes the Post-Endocytic Sorting of G Protein-Coupled Receptors to Lysosomes. *PLoS ONE* 5(2): e9325. doi:10.1371/journal.pone.000932
- Mennicken, F., Zhang, J., Hoffert, C., Ahmad, S., Beaudet, A. and O'Donnell, D. (2003) Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *The Journal of Comparative Neurology* 465:349-360 (2003).
- Michelsen, K., Yuan, H. and Schwappach, B. (2005) Hide and run: Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Reports*. 2005 Aug;6(8):717-22.
- Millan, M. J. (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 2002 Apr;66(6):355-474.
- Minervini, V., Lu, H. Y., Padarti, J., Osteicochea, D. C. and France, C. P. (2018) Interactions between Kappa and Mu opioid receptor agonists: effects of the ratio of drugs in mixtures. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018 August ; 235(8):2245-2256.
- Morgan, M. M. and Christie, M. J. (2011) Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *British Journal of Pharmacology* (2011) 164 1322-1334.
- Morinville, A., Cahill, C. M., Esdaile, M. J., Aibak, H., Collier, B., Kieffer, B. L. and Beaudet, A. (2003) Regulation of δ -opioid receptor trafficking via μ -opioid receptor stimulation: evidence from μ -opioid receptor knock-out mice. *The Journal of Neuroscience*, June 15, 2003 – 23(12):4888-4898.
- Morinville, A., Cahill, C. M., Aibak, H., Rymar, V. V., Pradhan, A., Hoffert, C., Mennicken, F., Stroh, T., Sadikot, A. F., O'Donnell, D., Clarke, P. B. S., Collier, B., Henry, J. L., Vincent, J-P. and Beaudet, A. (2004a) Morphine-induced changes in δ opioid receptor trafficking are linked to somatosensory processing in the rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, June 16, 2004 – 24(24):5549-5559.
- Morinville, A., Cahill, C. M., Kieffer, B., Collier, B. and Beaudet, A. (2004) Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain. *Pain* 109 (2004b) 266-273.
- Neves, S. R., Ram, P. T. and Iyengar, R. (2002) G protein pathways. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1636-9.

- Niesters, M., Dahan, A., Kest, B., Zacny, J., Stijnen, T., Aarts, L. and Sarton, E. (2010) Do sex differences exist in opioid analgesia? A systematic review and meta-analysis of human experimental and clinical studies. *Pain* 151 (2010) 61-68.
- Pareek, T. K., Keller, J., Kesavapany, S., Pant, H. C., Iadarola, M. J., Brady, R. O. and Kulkarni, A. B. (2006a) Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling. *PNAS* January 17, 2006. Vol. 103, No. 3, pp. 791-796.
- Pareek, T. K. and Kulkarni, A. B. (2006) Cdk5: A new player in pain signaling. *Cell Cycle*. 2006 Mar;5(6):585-8.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L. H. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):615-22.
- Perrine, S. A., Hoshaw, B. A. and Unterwald, E. M. (2006) Delta opioid receptor ligands modulate anxiety-like behaviors in the rat. *British Journal of Pharmacology* (2006) 147, 864-872.
- Petäjä-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Walker, P. and Bouvier, M. (2000) Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem*. 2000 May 5;275(18):13727-36.
- Pfeiffer, A., Brantl, V., Herz, A., Emrich, H. M. (1986) Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors. *Science*. 1986 Aug 15;233(4765):774-6.
- Popoff, V., Adolf, F., Brügger, B. and Wieland, F. (2011) COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a005231.
- Pradhan, A. A. A., Siau, C., Constantin, A. and Clarke, P. B. S. (2006) Chronic morphine administration results in tolerance to delta opioid receptor-mediated antinociception. *Neuroscience* 141 (2006) 947-954.
- Pradhan, A. A., Befort, K., Nozaki, C., Gavériaux-Ruff, C. and Kieffer, B. L. (2011) The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 Oct;32(10):581-90.
- Pradhan, A. A., Smith, M. L., Kieffer, B. L. and Evans, C. J. (2012) Ligand-directed signalling within the opioid receptor family. *British Journal of Pharmacology* (2012) 167 960-969.

- Qiu, C., Sora, I., Ren, K., Uhl, G. and Dubner, R. (2000) Enhanced δ -opioid receptor-mediated antinociception in μ -opioid receptor-deficient mice. *European Journal of Pharmacology* 387 (2000) 163-169.
- Ren, K. and Dubner, R. (2002) Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain* 100 (2002) 1-6.
- Rosciglione, S., Thériault, C., Boily, M-O., Paquette, M. and Lavoie, C. (2014) $G\alpha_s$ regulates the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Nat Commun.* 2014 Aug 4; 5:4556.
- Schug, S. A., Zech, D. and Grond, S. (1992) Adverse effects of systemic opioid analgesics. *Drug Safety* 7 (3): 200-213, 1992.
- Sharma, P., Steinbach, P. J., Sharma, M., Amin, N. D., Barchi, J. J. Jr. and Pant, H. C. (1999) Identification of substrate binding site of cyclin-dependent kinase 5. *J Biol Chem.* 1999 Apr 2;274(14):9600-6.
- Shiwerski, D. J., Tipton, A., Giraldo, M. D., Schmidt, B. F., Gold, M. S., Pradhan, A. A. and Puthenveedu, M. A. (2017) A PTEN-regulated checkpoint controls surface delivery of δ opioid receptors. *The Journal of Neuroscience*, April 5, 2017 – 37(14):3741-3752.
- Shiwerski, D. J., Crilly, S. E., Dates, A. and Puthenveedu, M. A. (2019) Dual RXR motifs regulate nerve growth factor-mediated intracellular retention of the delta opioid receptor. *Mol Biol Cell.* 2019 Mar 1; 30(5): 680-690.
- Simonin, F., Karcher, P., Boeuf, J. J-M., Matifas, A. and Kieffer, B. L. (2004) Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *Journal of Neurochemistry*, 2004, 89, 766-775.
- Smith, D. S. and Tsai, L. H. (2002) Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport? *Trends Cell Biol.* 2002 Jan;12(1):28-36.
- Smrcka, A. V. (2008) G protein $\beta\gamma$ subunits: Central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jul; 65(14):2191-2214.
- Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L. H., Filhol, O., Cochet, C., Bricket, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D. J., DeMaggio, A. J., Hoekstra, M. F., Blenis, J., Hunter, T. and Cantley, L. C. (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol.*

1996 Nov;16(11):6486-93.

- St-Louis, E., Degrandmaison, J., Grastilleur, S., Génier, S., Blais, V., Lavoie, C., Parent, J-L. and Gendron, L. (2017) Involvement of the coatamer protein complex I in the intracellular traffic of the delta opioid receptor. *Molecular and Cellular Neuroscience* 79 (2017) 53-63.
- Styers, M. L., O'Connor, A. K., Grabski, R., Cormet-Boyaka, E. and Sztul, E. (2008) Depletion of β -COP reveals a role for COP-I in compartmentalization of secretory compartments and in biosynthetic transport of caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C1485-C1498, 2008.
- Südhof, T. C. and Rothman, J. E. (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 2009 Jan 23;323(5913):474-7.
- Südhof, T. C. (2013) A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat Med* 2013 Oct;19(10):1227-31.
- Suzuki, R., Rygh, L. J. and Dickenson, A. H. (2004) Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol Sci*, 2004 Dec;25(12):613-7.
- Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R. and Huand, X-Y. (2016) Regulation, Signaling and Physiological Functions of G-proteins. *J Mol Biol.* 2016 September 25; 428(19):3850-3868.
- Takahashi, M., Kobayashi, Y., Ando, K., Saito, Y. and Hisanaga, S. (2019) Cyclin-dependent kinase 5 promotes proteasomal degradation of the 5-HT_{1A} receptor via phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 510 (2019) 370-375.
- Takasugi, T., Minegishi, S., Asada, A., Saito, T., Kawahara, H. and Hisanaga, S. (2015) Two degradation pathways of the p35 Cdk5 (cyclin-dependent kinase) activation subunit, dependent and independent of ubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 291, No. 9, pp 4649-4657, February 26, 2016.
- Tsai, L-H., Delalle, I., Caviness Jr, V. S., Chae, T. and Harlow, E. (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*. 1994 Sep 29;371(6496):419-23.
- Tseng, H-C., Zhou, Y., Shen, Y. and Tsai, L-H. (2002) A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS Letters* 523 (2002) 58-62.

- Wang, Y., Zhou, Y., Szabo, K., Haft, C. R. and Trejo, J. (2002) Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 13, 1965-1976, June 2002.
- Wang, C., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Huand, X-P., Liu, W., Siu, F. Y., Roth, B. L., Cherezov, V. and Stevens, R. C. (2013) Structure of the human smoothened receptor 7TM bound to an antihumor agent. *Nature*, 2013 May 16;497(7449):338-343.
- Watts, V. J. and Neve, K. A. (2005) Sensitization of adenylate cyclase by $G\alpha_{i/o}$ -coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 106 (2005) 405-421.
- Wettschureck, N. and Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85:1159-1204, 2005.
- Whistler, J. L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S. R. and von Zastrow, M. (2002) Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science*, 2002 Jul 26;297(5581):615-20.
- Xie, W-Y., He, Y., Yang, Y-R., Li, Y-F., Kang, K., Xing, B-M. and Wang, Y. (2009) Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the δ -opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance. *The Journal of Neuroscience*, March 18, 2009 – 29(11):3551-3564.
- Xing, B-M., Yang, Y-R., Du, J-X., Chen, H-J., Qi, C., Huang, Z-H., Zhang, Y. and Wang, Y. (2012) Cyclin-dependent kinase 5 controls TRPV1 membrane trafficking and the heat sensitivity of nociceptors through KIF13B. *The Journal of Neuroscience*, October 17, 2012 – 32(42):14709-14721.
- Yam, M. F., Loh, Y. C., Tan, C. S., Adam, S. K., Manan, N. A. and Basir, R. (2018) General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2164.
- Zhang, S., Edelmann, L., Liu, J., Crandall, J. E. and Morabito, M. A. (2008) Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*, January 9, 2008 – 28(2):415-424.
- Zhang, X., Bao, L., Shi, T-J., Ju, G., Elde, R., H and Okfelt, T. (1998) Down-regulation of μ -opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience Vol. 82, No. 1, pp. 223-240, 1998.*
- Zhu, S., Zhang, M., Davis, J. E., Wu, W. H., Surrao, K., Wang, H. and Wu, G. (2015) A

single mutation in helix 8 enhances the angiotensin II type 1a receptor transport and signaling. *Cell Signal*. 2015 December ; 27(12): 2371-2379.

Zubieta, J-K., Smith, Y. R., Bueller, J. A., Xu, Y., Kilbourn, M. R., Jewett, D. M., Meyer, C. R., Koeppe, R. A. and Stohler, C. S. (2002) μ -Opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. *The Journal of Neuroscience*, June 15, 2002, 22(12):5100-5107.